



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001330582 A**(43) Date of publication of application: **30.11.01**

(51) Int. Cl. **G01N 27/404**  
**G12Q 1/02**  
**G01N 27/416**  
**G01N 33/483**  
**// G01N 33/497**

(21) Application number: **2000153013**(22) Date of filing: **24.05.00**(71) Applicant: **JAPAN  
SCIENCE & TECHNOLOGY CORP**

(72) Inventor: **SHUKU HITOSHI  
SHIRAISHI TAKUO  
OYA HIROAKI  
SUENAGA TOMOKAZU  
ABE HIROYUKI  
HOSHI HIROYOSHI**

**(54) CELL RESPIRATORY ACTIVITY EVALUATION  
METHOD AND ITS DEVICE**

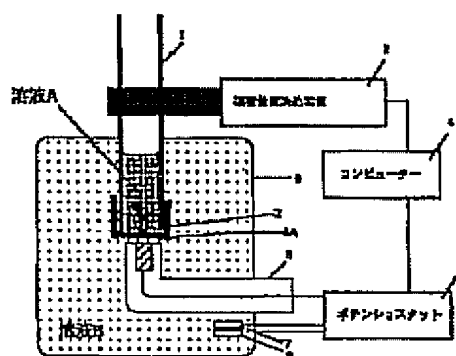
**(57) Abstract**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a cell respiratory activity evaluation method and its device capable of evaluating metabolic activities such as respiratory activity or photosynthetic activity in a sample solution including a biosample such as a cell, by measuring a local oxygen concentration change near the sample solution.

**SOLUTION:** The sample solution A is set in a capillary tube 1, and an oxygen permeable film 2 is arranged on an capillary tube opening, and the tube is dipped in a measuring solution B. A micro-electrode 6 is installed near the capillary tube opening, and a reference electrode 7 and a counter electrode 8 corresponding to the micro-electrode 6 are arranged. The micro-electrode 6 is used as a working electrode, and potential control and current detection are executed between the reference electrode 7 and the counter electrode 8. The micro-volume sample solution A is prepared, and three-dimensional position control of the

capillary tube 1 is executed, and the oxygen concentration in the sample is selectively evaluated by a reduction current.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO





## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2002122568 A

(43) Date of publication of application: 26.04.02

(51) Int. Cl.

G01N 27/416  
 C12M 1/34  
 C12N 5/06  
 C12Q 1/02  
 G01N 27/30  
 G01N 27/327  
 //(C12N 5/06 , C12R 1:91 )

(21) Application number: 2000312882

(22) Date of filing: 13.10.00

(71) Applicant: JAPAN SCIENCE &amp; TECHNOLOGY CORP

(72) Inventor: SHUKU HITOSHI  
 SHIRAISHI TAKUO  
 OYA HIROAKI  
 SUENAGA TOMOKAZU  
 ABE HIROYUKI  
 HOSHI HIROYOSHI

## (54) METHOD AND APPARATUS FOR NONINVASIVE QUALITY EVALUATION OF MAMMAL EMBRYO

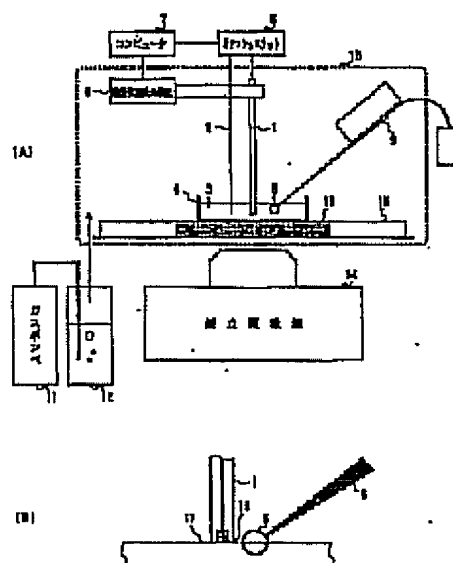
## (57) Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method and an apparatus, for the noninvasive quality evaluation of a mammal embryo, wherein the shape of the mammal embryo is observed, the oxygen consumption as an index of the metabolic activity of the mammal embryo is measured and the viability and the normality of each mammal embryo can be grasped at an early stage and precisely.

**SOLUTION:** In order to perform the noninvasive quality evaluation of the mammal embryo, the noninvasive quality evaluation apparatus is provided with (a) a microscope which observes the shape of a single mammal embryo, (b) an electrochemical microscope which measures the oxygen consumption of the single mammal embryo, (c) a measuring solution 3 which conforms to a culture solution, (d) a means in which a change in an oxygen concentration near the single embryo is quantitatively determined with high spatial resolution by using (a), (b) and (c), (e) a means in which the relationship between the size of the mammal embryo created in advance by (d) and the oxygen consumption as well as the later generation result of the mammal embryo are added up and (f) a means in which the normality of the mammal embryo is judged by (e). The electrochemical

microscope is provided with a microelectrode 1 which is installed on a microstage 15, an electrode positioning device 18, a very small current measuring device 8, a temperature controller 10 and a culture gas-phase condition (oxygen, carbon dioxide) controller.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO




**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : <div style="text-align: center; font-weight: bold;">C12M 1/34</div>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/44876</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00)
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00071</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Januar 2000 (05.01.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 03 506.7      29. Januar 1999 (29.01.99)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR CHEMO- UND BIOSENSORIK MÜNSTER E.V. [DE/DE]; Mendelstrasse 11, D-48149 Münster (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KATERKAMP, Andreas [DE/DE]; Wilhelmstrasse 65, D-48149 Münster (DE). KEY, Göran [DE/DE]; Jeggenerweg 160, D-49084 Osnabrück (DE). CHEMNITZUS, Gabriele [DE/DE]; Friedrich-Ebert-Strasse 174, D-48153 Münster (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG &amp; PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).</p> </div> <div style="width: 48%; vertical-align: top;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </div> </div>		

(54) Title: METHOD, VESSEL AND DEVICE FOR MONITORING METABOLIC ACTIVITY OF CELL CULTURES IN LIQUID MEDIA

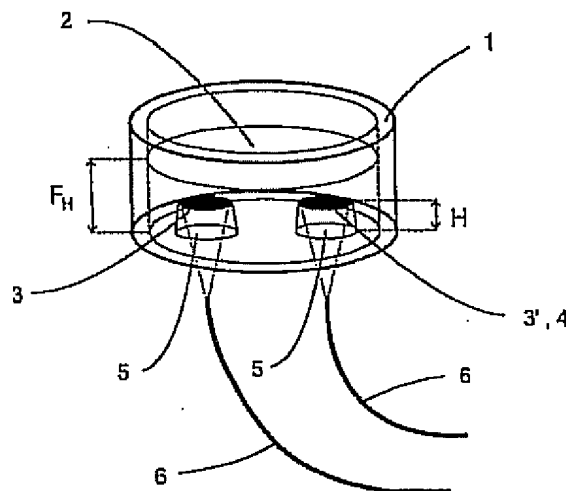
(54) Bezeichnung: VERFAHREN, GEFÄSS UND VORRICHTUNG ZUR ÜBERWACHUNG DER STOFFWECHSELAKTIVITÄT VON ZELLKULTUREN IN FLÜSSIGEN MEDIEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for monitoring metabolic activity of cells in liquid media, to an appropriate vessel and to a device for implementing said method. The invention aims at enhancing measuring accuracy and reducing the costs involved in monitoring oxygen consumption and metabolic activity in culture cells. To this end, oxygen concentration is optically determined with the aid of sensor membranes in a liquid medium located in partially oxygen permeable vessels. The measured oxygen concentrations in the vessels containing culture cells in a liquid medium are compared with the measured oxygen concentration in a vessel containing only such a liquid medium without cells and/or with an oxygen concentration calculated using the measured values of other parameters.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überwachung der Stoffwechselaktivität von Zellen in flüssigen Medien, ein geeignetes Gefäß und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Mit der erfindungsgemässen Lösung sollen die Messgenauigkeit erhöht und die erforderlichen Kosten für die Überwachung des Sauerstoffverbrauches und damit der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen verringert werden können. Hierfür wird die Sauerstoffkonzentration optisch mit Sensormembranen in einem flüssigen Medium, das in teilweise für Sauerstoff durchlässigen Gefässen aufgenommen ist, bestimmt. Dabei werden die gemessenen Sauerstoffkonzentrationen, die in Gefässen, die kultivierte Zellen in einem flüssigen Medium enthalten, mit einer gemessenen Sauerstoffkonzentration, in einem Gefäss, in dem lediglich ein solches flüssiges Medium, ohne Zellen enthalten ist und/oder einer mit Messwerten anderer Parameter berechneten Sauerstoffkonzentration einem Wertevergleich unterzogen.



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfblättern der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SW	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

5

Verfahren, Gefäß und Vorrichtung zur Überwachung  
der Stoffwechselaktivität von Zellkulturen  
in flüssigen Medien

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überwachung der Stoffwechselaktivität von Zellen in flüssigen Medien, ein hierfür besonders geeignetes Gefäß und entsprechende Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

15

In den Gefäßen sind zu kultivierende Zellen sowie ein flüssiges Medium enthalten, wobei es sich bei letzterem, um eine herkömmlich gegebenenfalls der verwendeten Zellen entsprechende Nährlösung handelt. Die erfindungsgemäße Lösung kann für die verschiedensten Zellen und die verschiedensten Untersuchungen, insbesondere im pharmakologischen Bereich eingesetzt werden, wobei die Stoffwechselaktivität der Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden kann.

20

25

Es kann z.B. eine Wirkungsüberwachung bei Cytotoxizitäts- und Biokompatibilitätstests durchgeführt werden, oder die Optimierung der Kulturbedingungen für die Produktion von Biomolekülen.

30

Die Hauptnährstoffquelle für Zellkulturen ist üblicherweise Glukose, die durch aerobe Glukolyse zu Laktat oder oxidativ unter Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxid-Bildung umgewandelt werden kann. Dabei wirken sich viele Einflüsse der Physiologie einer Zelle in ihrer Stoffwechselaktivität aus, so daß auch der

35

Sauerstoffverbrauch entsprechend schwanken kann. Ausgehend vom Zusammenhang Stoffwechselaktivität der Zellen in bezug zum Sauerstoffverbrauch und z.B. dem Glukose, L-Glutamin Verbrauch oder der Erzeugung von Laktat kann aus deren Kenntnis auf den Zustand der überwachten Zellen und demzufolge auf den Einfluß der jeweiligen Kulturbedingungen geschlossen werden.

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend ist von Lisa Randers-Eichhorn u.a. in "Noninvasive Oxygen Measurements and Mass Transfer Considerations in Tissue Culture Flasks", veröffentlicht in Biotechnology and Bioengineering, Vol. 51, Seiten 466 bis 478 beschrieben worden, wie der Sauerstoffverbrauch von in T-Flaschen kultivierten Zellen durch optische Messung bestimmt werden kann. Dort wird vorgeschlagen, Fluoreszenzindikatoren enthaltende Sensormembranen unmittelbar auf dem Flaschenboden und im Gasraum oberhalb der Nährlösung in einer solchen T-Flasche anzuordnen. Bei der Sauerstoffkonzentrationsmessung mit solchen Sensormembranen wird das bekannte physikalische Phänomen der Fluoreszenzlöschung bekannter Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Ruthenium (II)-Komplexe, infolge von Sauerstoffeinfluß ausgenutzt, wobei sich die jeweilige Fluoreszenzintensität, bei konstanter Anregung entsprechend der Sauerstoffkonzentration bzw. des Sauerstoffpartialdruckes verändert. Zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration kann die jeweilige Fluoreszenzintensität unmittelbar aber auch die Fluoreszenzlebensdauer gemessen werden und anhand einer bekannten Kalibration die Sauerstoffkonzentration bestimmt werden.

Die in diesem Dokument beschriebene Meßanordnung, insbesondere die Anordnung der Sensormembran auf dem

Boden der T-Flaschen und die vernachlässigte Bestimmung einiger wichtiger Einflußgrößen, eignet sich nicht dazu, über den Sauerstoffverbrauch auf die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen zu schließen.

Der Eintrag von Sauerstoff in die Nährlösung erfolgt zum größten Teil über die Grenzfläche der Nährlösung zum Gasraum, hier also zum Gasraum in der T-Flasche und der Verbrauch erfolgt durch die auf dem Boden der T-Flasche befindlichen Zellen. Die maximal mögliche Sauerstoffkonzentration, die in der Nährlösung erreicht werden kann, ist die Sauerstoffsättigungskonzentration  $C_{\text{sat}}$  (in mg/l), die nach der Gleichung

$$C_{\text{sat}} = ([p - \gamma \cdot p_w(T)] / p_o) \cdot \alpha(T) \cdot X_{O_2}$$

vom Gesamtgasdruck  $p$  (in mbar), der relativen Feuchte  $\gamma$  (in Werten von 0 bis 1, wobei 1 einem Wert von 100 % und 0 einem von 0% entspricht), dem Wasserdampfpartialdruck  $p_w(T)$  (in mbar) in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$ , dem Molenbruch des Sauerstoffs  $X_{O_2}$  im Gasraum der T-Flasche, dem Bunsen'schen Absorptionskoeffizienten  $\alpha(T)$  (in mg/l) in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  und dem Normaldruck  $p_o = 1013$  mbar abhängt. Dabei ist vorausgesetzt, daß der Gasraum und die Nährlösung die gleiche Temperatur besitzen und der Gasraum mit atmosphärischer Luft, deren chemische Zusammensetzung hinlänglich bekannt ist, gefüllt wurde. Diese Voraussetzungen sind üblicherweise in Brutschränken, in denen Zellen kultiviert werden, gegeben. Diese Sauerstoffsättigungskonzentration stellt sich direkt unterhalb der Oberfläche in der Nährlösung ein. Von dort wird der Sauerstoff durch unterschiedliche Effekte, wie Diffusion und/oder Konvek-

tion zu den am Boden befindlichen Zellen transportiert. Zwei Größen sind in einem solchen System maßgebend. Zum einen ist dieses die Verbrauchsrate  $k_v$ , mit der der Sauerstoff durch die Zellen verbraucht wird und zum anderen die Transportrate  $k_T$ , mit der der Sauerstoff zu den Zellen transportiert wird. Beide Größen zusammen sind verantwortlich dafür, daß von der Oberfläche der Nährlösung zum Boden mit Zellen ein Sauerstoffgradient entsteht. Ist nun die Verbrauchsrate geringfügig kleiner oder gleich groß wie die Transportrate, so wird mit der Sauerstoffmembran am Boden unterhalb der Zellen eine Sauerstoffkonzentration vom Wert Null bestimmt. Die Zellen leiden in diesem Fall aber nicht an einer Sauerstoffversorgung, da noch genügend Sauerstoff zu den Zellen transportiert wird, dieser aber nicht mehr zur Sensormembran unterhalb der Zellen gelangt und entsprechend auch nicht mehr gemessen werden kann. Wenn die Verbrauchsrate weiter ansteigt, z.B. durch Vermehren der Zellen, und die Verbrauchsrate größer wird als die Transportrate, so kann dieses mit der Sauerstoffmembran am Boden unterhalb der Zellen auch nicht mehr beobachtet werden. Weiterhin ist die Sauerstoffsättigungskonzentration neben der Verbrauchs- und Transportrate in Abhängigkeit vom Gesamtgasdruck, der Feuchte, der Temperatur und dem Molenbruch des Sauerstoff bzw. dem Sauerstoffpartialdruck im Gasraum der T-Flasche eine sehr wichtige Größe. Eine Änderung verursacht eine Änderung des Sauerstoffgradienten und damit eine Änderung der Sauerstoffkonzentration an einer beliebigen Stelle zwischen den Zellen und der Oberfläche der Nährlösung. Da die Parameter Gesamt-  
druck, Feuchte und Temperatur in der genannten Dokumentation nicht bestimmt oder kontrolliert wurden, ist nicht auszuschließen, daß durch Schwankungen in

diesen Parametern die Meßergebnisse verfälscht wurden.

5 Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Möglichkeiten vorzugeben, mit der die Überwachung des Sauerstoffverbrauches und damit die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen kostengünstig und mit erhöhter Genauigkeit erreicht werden kann.

10 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit den Merkmalen des Anspruchs 1 für ein Verfahren und den Merkmalen des Anspruchs 11 für ein geeignetes Gefäß gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungsformen und Weiterbildungen der Erfindung, ergeben sich mit den in den untergeordneten Ansprüchen genannten Merkmalen.

15

Die erfindungsgemäße Lösung geht nunmehr davon aus, daß Zellen in Gefäßen unter Verwendung eines flüssigen Mediums, wobei es sich hier in der Regel um eine entsprechende Nährlösung handelt, kultiviert werden und deren Stoffwechselaktivität über die Messung der Sauerstoffkonzentration, an einem Ort im flüssigen Medium zwischen den Sauerstoff verbrauchenden Zellen und dem für den Sauerstoffeintrag in das flüssige Medium maßgebenden Teil, hier die Oberfläche der Nährlösung, erfolgt. Dabei wird die Sauerstoffsättigungskonzentration im flüssigen Medium anhand von Vergleichsmessungen in einem Zellkulturgefäß ohne Zellen und/oder über die Bestimmung der Parameter Druck, Feuchte, Temperatur und bei bekannter und konstanter chemischer Zusammensetzung des umgebenden Gasraumes, hier die Molenbrüche der Gaskomponenten bzw. deren Partialdrücke in atmosphärischer Luft bestimmt. Aus dem Vergleich zwischen der Sauerstoffsättigungskonzentration als Sollwert und der Sauerstoff-

20

25

30

35

konzentration an einer Stelle des Sauerstoffgradienten im Gefäß mit den kultivierten Zellen als Istwert wird der auf den Sauerstoffverbrauch und damit auf die Stoffwechselaktivität der Zellen geschlossen.

5

Für die Überwachung können hierbei, im Gegensatz zum Stand der Technik, ohne weiteres Gefäße verwendet werden, die über eine Öffnung verfügen, so daß die Oberfläche des flüssigen Mediums von der umgebenden Atmosphäre beeinflusst werden kann. Eine solche Öffnung kann in bestimmten Fällen aber auch mit einer zumindest für Sauerstoff permeablen Membran abgedeckt bzw. abgeschlossen sein, so daß beispielsweise ein Eindringen unerwünschter Keime verhindert werden kann.

10

15

Die Sauerstoffkonzentration wird, bevorzugt optisch mit einer hierfür geeigneten Sensormembran gemessen, deren optische Eigenschaften sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Sauerstoffkonzentration verändern. Es sollte sich also in einem entsprechenden Gefäß, zumindest eine geeignete Sensormembran befinden, die so angeordnet ist, daß sie oberhalb der auf dem Gefäßboden kultivierten Zellkulturen, jedoch unterhalb der Oberfläche des flüssigen Mediums angeordnet ist.

20

25

Verbrauchen die auf dem Gefäßboden kultivierten Zellen Sauerstoff, wird sich entsprechend die Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium verringern und die tatsächlich mit der Sensormembran gemessene Sauerstoffkonzentration wird durch den Sauerstoffverbrauch infolge Stoffwechselaktivität und der Sauerstoffmenge, die infolge des aufgetretenen Sauerstoffkonzentrationsgradienten wieder in das flüssige Medium hinein gelangt, bestimmt.

30

35

Da die Gesetzmäßigkeiten für die Sättigungskonzentration von Sauerstoff in flüssige Medien relativ genau bekannt sind, besteht die Möglichkeit, bei Berücksichtigung bekannter Parameter, hier insbesondere der entsprechenden Temperatur, Druck und Feuchte die entsprechende Sauerstoffsättigungskonzentration in einem flüssigen Medium zu berechnen, so daß dieser berechnete Sauerstoffkonzentrationswert einem Wertevergleich mit der tatsächlich gemessenen Sauerstoffkonzentration für die Bewertung des Sauerstoffkonsums bzw. der Stoffwechselaktivität der Zellkulturen unterzogen werden kann.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, eine Referenzmessung durchzuführen, wobei ein zweites Gefäß verwendet wird, in dem lediglich ein Nährmedium, das bezüglich der Sauerstoffindiffusionseigenschaften mit den verwendeten Nährlösungen völlig identisch ist, verwendet wird. In einem solchen Referenzgefäß ist wiederum, bevorzugt an gleicher Stelle eine entsprechende Sensormembran angeordnet, mit der die unbefeußte Sauerstoffkonzentration gemessen werden kann. Auch die so gemessene Referenzsauerstoffkonzentration kann mit der durch Stoffwechselaktivität beeinflussten Sauerstoffkonzentration einem entsprechenden Wertevergleich unterzogen werden, um die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen zu beurteilen.

Selbstverständlich kann ein solcher Wertevergleich auch gemeinsam für die berechnete Sauerstoffkonzentration und das Sauerstoffkonzentrationsmeßsignal im Referenzgefäß mit der unter von kultivierten Zellen moderierten Stoffwechsel gemessenen Sauerstoffkonzentration gleichzeitig durchgeführt werden.

Die Aussagekraft bei der Bewertung der Stoffwechselaktivität von kultivierten Zellen kann außerdem erhöht werden, wenn zusätzlich Sensormembranen in den Gefäßen und diese hier wiederum so angeordnet werden, wie die sauerstoffsensitiven Membrane, die eine Oxidoreductase auf einer sauerstoffsensitiven Membran enthalten und mit denen die Sauerstoffkonzentrationsänderung durch Substratumsatz des Enzyms gemessen werden kann.

Günstigerweise sollten diese beiden verschiedenen Sensormembranen im zumindest nahezu gleichen Abstand von den Zellkulturen innerhalb des flüssigen Mediums angeordnet sein. Zur Ermittlung der Konzentration des Oxidoreductasesubstrats und damit der Stoffwechselaktivität werden die Floreszenzsignale der Sauerstoffmembran und der zweiten Sauerstoffmembran, die mit der zusätzlichen Membran belegt ist, verglichen. Dabei kann es notwendig sein, das Signal der ersten Sensormembran von dem Signal der zweiten Sensormembran abzuziehen, um so die Sensorantwort auf den enzymatischen Versuch des Sauerstoffs zu erhalten und damit die Substratkonzentration zu bestimmen. Dabei kann auch die Einführung eines Faktors vorteilhaft sein, durch den die unterschiedlichen Sauerstofftransportverhältnisse an den beiden Sensormembranen berücksichtigt sind. Es kann außerdem auch notwendig sein, zur Auswertung des Signals des enzymatischen Sensors je nach Sauerstoffkonzentration in der Lösung verschiedene Kalibrationskurven zu verwenden, da Sauerstoff ein Cosubstrat der enzymatischen Reaktion ist. In jedem Fall kann durch eine Bestimmung der Enzymaktivität die Stoffwechselaktivität der Zellen im weiteren unabhängig vom Sauerstoffverbrauch der kultivierten Zellen bestimmt werden.

Da sich die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen relativ langsam über größere Zeiträume verändert, genügt es, die jeweiligen Konzentrationen in größeren Zeitabständen, beispielsweise in Intervallen von mehreren Minuten zu messen, um mit ausreichender Genauigkeit, die Stoffwechselaktivität der jeweiligen Zellkulturen zu überwachen, was zur Folge hat, daß sich der erforderliche Aufwand für einen geeigneten Meßaufbau durch einen möglichen Muiltplexbetrieb verringern läßt.

Da die Konzentration vorteilhaft optisch gemessen werden soll, ist es erforderlich, Gefäße zu verwenden, die zumindest in bestimmten Bereichen optisch transparent sind, so daß die entsprechende Lichtintensitätsänderung, beispielsweise mit Lichtwellenleitern (Glasfasern) und einem geeigneten optischen Sensor gemessen werden kann. Dabei muß ein solcher Lichtwellenleiter nicht unmittelbarer Bestandteil eines verwendeten Gefäßes oder mit diesem unmittelbar verbunden sein, sondern er kann so angeordnet und ausgerichtet sein, daß er lediglich mit seiner Apertur den Bereich oder Teile einer Sensormembran erfassen kann. Meßort und Meßgefäß können demzufolge ohne weiteres örtlich voneinander getrennt sein.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, wie bereits mit der Möglichkeit der multiplexen Messung angedeutet, mehrere Gefäße, in denen gleiche oder verschiedene Zellen kultiviert werden, gemeinsam zu überwachen, wobei diese jeweils einzeln nacheinander durch entsprechende Schaltung zumindest eines Multiplexers berücksichtigt werden können. Es kann daher eine quasi orts aufgelöste Messung von Konzentrationen durchgeführt werden. Es können z.B. Sensormembranen ver-

wendet werden, die sauerstoffkonzentrationsabhängig ihre Absorptions- bzw. Reflexionseigenschaften ändern. Es besteht aber auch die Möglichkeit, aufbauend auf bekannten Lösungen, das Phänomen der Fluoreszenzlöschung auszunutzen und Sensormembranen zu verwenden, in denen bekannte Fluoreszenzfarbstoffe enthalten sind, die in der Lage sind, bei Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen zu fluoreszieren, wobei die Wellenlänge des Anregungslichtes und die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes unterschiedlich sind.

Im letztgenannten Fall kann die Konzentration einmal durch direkte Messung der jeweiligen Fluoreszenzintensität gemessen werden. Günstiger ist es aber, die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen, da in diesem Fall die Alterung und demzufolge auch das bekannte Ausbleichverhalten die Meßgenauigkeit nicht beeinflußt.

Die sauerstoffsensitiven Sensormembranen können mittels verschiedenster Techniken auch nachträglich in, für die erfindungsgemäße Lösung verwendbare Gefäße eingebracht werden. Solche Sensormembranen können durch Dispensieren, Sprühen, Tauchen oder auch Kleben lokal gezielt aufgebracht werden. Geeignete Anbringungsorte in solchen Gefäßen sind z.B. die Gefäßinnenwand in einem bestimmten Abstand vom Gefäßboden und besonders geeignet sind über die Gefäßbodenfläche hinausragende podestartige Elemente, auf deren oberer Stirnfläche eine entsprechende Sensormembran ausgebildet bzw. aufgebracht werden kann. In diesem Fall sind zumindest die podestartigen Elemente aus einem für die relevanten Wellenlängen transparenten Material gebildet, so daß das entsprechende Monitoring von unten durch den Gefäßboden erfolgen kann. Die übrigen

Gefäßbestandteile müssen dann nicht zwingend aus einem transparenten Material bestehen.

5 In einem erfindungsgemäß verwendbaren Gefäß können in einem Abstand voneinander zwei solcher podestartigen Elemente angeordnet sein, auf denen einmal eine ausschließlich sauerstoffsensitive Sensormembran aufgebracht ist und zum anderen eine solche, die mit einer enzymatischen Oxidase beschichteten Membran gegenüber dem flüssigen Medium abgeschlossene Zusatzmembran  
10 ausgebildet ist, aufgebracht sein kann.

Besonders günstig ist es, wenn beispielsweise eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig überwacht werden soll, ein erfindungsgemäßes Gefäß, analog zu den  
15 bekannten Mikrowellplatten auszubilden, bei dem in einer solchen Mikrowellplatte eine größere Anzahl von Aufnahmeräumen (Kavitäten) für die zu kultivierenden Zellen mit dem flüssigen Medium in mehreren Reihen nebeneinander angeordnet sind. Eine so ausgebildete Mikrowellplatte kann dann beispielsweise in einem Brutschrank zur Zellkultivierung untergebracht sein, wobei das Anregungslicht und das Fluoreszenzlicht über Lichtwellenleiter von einer geeigneten Licht-  
20 quelle auf die Sensormembranen und das Fluoreszenzlicht von den Sensormembranen zu einem geeigneten optischen Sensor geführt werden kann. Dabei besteht die Möglichkeit, daß sowohl das Anregungslicht, wie auch das Fluoreszenzlicht durch einen einzigen Licht-  
25 wellenleiter geführt wird. Selbstverständlich kann auch eine entsprechende Lichtführung für die beiden verschiedenen Lichtarten in zwei gesonderten Lichtwellenleitern durchgeführt werden. Die Lichtwellenleiter müssen hierfür lediglich so fixiert und positioniert werden, daß ihre Aperturen eine optimale  
30  
35

Fluoreszenzanregung und eine nahezu vollständige Erfassung des Fluoreszenzlichtes sichern. Dabei können zur Fixierung und Positionierung der Lichtwellenleiter gesonderte Halteplatten verwendet werden, die  
5 entsprechend der erfindungsgemäß zu verwendenden Gefäße dimensioniert und ausgerichtet werden, so daß die Lichtwellenleiter in bezug zu den Sensormembranen angeordnet und ausgerichtet sind. Diese Ausführung bietet sich insbesondere für mikrowellplattenförmig  
10 ausgebildete Gefäße an. Günstigerweise ist eine Kavität (Well) eines solchen mikrowellplattenförmigen Elementes für die bereits eingangs erwähnte Referenzmessung, d.h. lediglich mit flüssigem Medium, aber ohne Zellkulturen befüllt, verwendbar.

15 Die Ausführungsform für erfindungsgemäß ausgebildete und verwendbare mikrowellplattenförmige Elemente oder auch andere geeignete Gefäße können entsprechend der üblichen Laborstandards ausgebildet sein, so daß sie  
20 auch in herkömmlicher Form mit den verschiedenen bekannten Laborgeräten benutzt werden können.

Die orts aufgelöste Messung verschiedener Proben kann aber nicht nur mit den einzelnen Sensormembranen  
25 zugeordneten Lichtwellenleitern erfolgen, sondern es besteht außerdem die Möglichkeit eine Endoskopieanordnung zu verwenden, über die das mit ihr erfaßte Abbild einer größeren Anzahl von Sensormembranen auf  
beispielsweise eine CCD-Kamera gerichtet werden kann,  
30 so daß eine zeitgleiche orts aufgelöste Messung der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen möglich wird.

Nachfolgend soll die Erfindung beispielhaft näher  
beschrieben werden.

Dabei zeigen:

- Figur 1 eine schematische Darstellung eines Beispiels eines Gefäßes für die Überwachung der Stoffwechselaktivität von kultivierten Zellen in flüssigen Medien mit Sensormembranen und Lichtwellenleiter;
- Figur 2 ein Diagramm mit dem schematisch die Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium vom Boden, auf dem sich die kultivierten Zellen befinden, des Gefäßes bis zur Oberfläche des Mediums, das im Gefäß enthalten ist, unter drei verschiedenen Bedingungen, wiedergegeben ist;
- Figur 3 schematische Darstellungen von podestartigen Elementen mit sauerstoffsensitiven Membranen und alternativ einer zusätzlichen Oxidoreductase/Membran;
- Figur 4 schematisch eine Möglichkeit für einen optischen Meßaufbau zur Fluoreszenzsignal-Erzeugung und Detektion an einer Vorrichtung gemäß Figur 1;
- Figur 5 eine schematische Darstellung eines weiteren Beispiels eines Gefäßes mit sauerstoff-permeabler Abdeckung zur Überwachung der Stoffwechselaktivität von kultivierten Zellen in flüssigen Medien;
- Figur 6 ein Diagramm mit dem die Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium vom Boden, auf dem sich die kultivierten Zellen befinden,

5 eines mit einer sauerstoffdurchlässigen Membran abgedeckten Gefäßes, unter drei verschiedenen Bedingungen, bis zur Oberfläche eines flüssigen Mediums, und weiter bis zur Umgebung in der das Gefäß enthalten ist, wiedergegeben ist;

10 Figur 7 eine schematische Darstellung eines in einem Brutschrank aufgenommenen Gefäßes, gemäß Figur 1;

15 Figur 8 ein Multigefäß in Verbindung mit einer Halteplatte für Lichtwellenleiter, die an eine Vorrichtung gemäß Figur 4 angeschlossen sind;

Figur 9 eine schematische Darstellung für eine Multiplexerfassung mehrerer Proben;

20 Figur 10 ein Beispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der eine Multiwellplatte mittels einer abbildenden, z.B. Endoskopieanordnung, Optik überwacht wird;

25 Figur 11 den optischen Teil einer Vorrichtung gemäß Figur 10 zur Fluoreszenzsignal Erzeugung und Detektion;

30 Figur 12 ein Beispiel eines optischen Systems zur Fluoreszenzsignal Erzeugung und Detektion an einer Multiwellplatte zur gleichzeitigen Überwachung mehrerer Zellkulturen.

35 In der Figur 1 ist eine schematische Darstellung eines Beispiels eines Gefäßes 1 für die Überwachung der

Stoffwechselaktivität von Zellkulturen in flüssigen Medien 2 gezeigt.

5 Das hier dargestellte Gefäß 1 ist überwiegend zylinderförmig ausgebildet hat eine optisch transparente Bodenplatte und ist an seiner Oberseite offen und demzufolge dort auch für Sauerstoff transparent ins flüssiges Medium 2 durchlässig. Das flüssige Medium 2 ist mit einer bestimmten Füllhöhe  $F_H$  befüllt, in dem  
10 die Zellen kultiviert werden können. Am Boden des Gefäßes 1 sind bei diesem Beispiel zwei podestartige Elemente 5, aus einem optisch transparenten Material ausgebildet, deren obere Stirnflächen in einem bestimmten Abstand  $H$  von der Bodenfläche des Gefäßes 1  
15 angeordnet sind. Dabei ist  $H$  generell kleiner als  $F_H$

Auf der Stirnfläche des linken podestartigen Elements 5 ist eine Sensormembran 3 für die ausschließliche Messung der Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium 2 ausgebildet.  
20

Auf der Stirnfläche des rechten podestartigen Elements 5 ist auf eine sauerstoffsensitive Sensormembran 3' zusätzlich eine Oxidoreductase Membran 4 ausgebildet.  
25

Unterhalb des Gefäßes 1 sind jeweils für eine der Sensormembranen 3 und 3' Lichtwellenleiter 6, mit denen auf die Sensormembranen 3 ausgerichteten Lichtstrahlen (gestrichelt dargestellt) angeordnet. Durch  
30 die Lichtwellenleiter 6 kann Licht zur Fluoreszenzanregung eines in den Sensormembranen 3 und 3' enthaltenen fluoreszierenden Farbstoffes auf die Sensormembranen 3 und 3' gerichtet werden. Gegenläufig kann  
35 das Fluoreszenzlicht der Sensormembranen 3 und 3'

durch die Lichtwellenleiter 6 aufgefangen werden.

In der Figur 2 ist in einem Diagramm die Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium 2 mit am Boden befindenden kultivierten Zellen, ausgehend vom Boden eines Gefäßes 1 bis zur Oberfläche des flüssigen Mediums 2, unter drei verschiedenen Bedingungen, im Gefäß 1 dargestellt. Die unterste Kurve zeigt den Verlauf bei hohem Sauerstoffkonsum der kultivierten Zellen auf dem Boden und die oberste Kurve bei geringem Sauerstoff.

Dem Diagramm ist deutlich zu entnehmen, daß mit einer oberhalb des Gefäßbodens angeordneten Sensormembran 3 wesentlich höhere Werte einer Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium gemessen werden können, wohingegen die Sauerstoffkonzentration am Boden eines Gefäßes 1 gegen null strebt. Dies ist durch den Sauerstoffkonsum der kultivierten Zellen bedingt. Es wird so deutlich, daß eine Messung am Boden in unmittelbarer Nähe zu den Zellen nicht sinnvoll ist. Außerdem gibt dieses Diagramm den Sachverhalt wieder, daß bei einem Sauerstoffverbrauch der kultivierten Zellen mit einer Sensormembran oberhalb des Bodens eine Nachführung von Sauerstoff in das flüssige Medium 2 über deren Oberfläche bis zu den Zellen hin erfaßt werden kann. Es wird so deutlich, daß eine Sauerstoffmessung nur sinnvoll an einer Position zwischen den kultivierten Zellen und den Orten, an denen der Sauerstoff in das flüssige Medium 2 gelangt, ist.

In der Figur 3 ist schematisch die Ausbildung podestartiger Elemente 5 dargestellt, wobei die linke Darstellung ein podestartiges Element 5 zeigt, das ausschließlich mit einer sauerstoffsensitiven Membran 3

versehen ist. Das podestartige Element 5 ist hier  
kegelstumpfförmig ausgebildet und besteht aus einem  
transparenten und für Sauerstoff zumindest nahezu  
undurchlässigem Material, mit dem erreicht werden  
5 kann, daß das Meßergebnis nicht durch über das Mate-  
rial eindringenden Sauerstoff verfälscht wird.

Analog hierzu ist auch das in Figur 3 rechts darge-  
stellte podestartige Element 5 ausgebildet, wobei  
10 lediglich über der sauerstoffsensitiven Membran 3'  
eine zusätzliche Oxidoreductase-Membran 4 vorhanden  
ist.

Selbstverständlich sind die Membranen 3, 3' und 4  
15 nicht, wie hier dargestellt, oberhalb, sondern unmit-  
telbar auf den podestartigen Elementen 5 ausgebildet.  
Dabei überdeckt die Oxidoreductase-Membran 4 die sau-  
erstoffsensitive Membran 3'.

In der Figur 4 ist schematisch ein optischer Aufbau  
dargestellt, mit dem über einen Lichtwellenleiter 6  
das Licht einer Lichtquelle 20 auf eine, hier nicht  
dargestellte, sauerstoffsensitive Membran 3 in einem  
Gefäß 1 bzw. einer Kavität 7, 7' gerichtet werden  
25 kann. Die Lichtquelle 20 strahlt bevorzugt nahezu  
monochromatisches Licht einer fluoreszenzanzregenden  
Lichtwellenlänge über eine entsprechende Linse 27,  
gegebenenfalls einen Filter 21, der im wesentlichen  
Licht mit der Anregungswellenlänge durchläßt auf  
30 einen dichroidischen Strahlteiler 22. Das Licht wird  
von dort über eine Linse 23 in den Lichtwellenleiter  
6 einkoppelt. Selbstverständlich können auch andere  
bekannte Einkoppeloptiken für Lichtwellenleiter 6  
Verwendung finden. Es kann auch eine multispektrale  
35 Lichtquelle in Verbindung mit einem geeigneten Filter

verwendet werden, wobei ausschließlich der Filter die Monochromatisierung bewirkt.

5 Das Fluoreszenzlicht gelangt dann gegenläufig zum Anregungslicht durch den Lichtwellenleiter 6 über die Linse 23, einen Strahlteiler 22, durch einen entsprechend wellenlängenselektierten Filter 24, der nur Fluoreszenzlicht passieren läßt, gegebenenfalls über eine weitere Linse 25 auf einen optischen Detektor  
10 26, mit dem die Intensität des Fluoreszenzlichtes, in Abhängigkeit von der jeweiligen Sauerstoffkonzentration gemessen werden kann.

15 Das in der Figur 5 dargestellte Gefäß 1, entspricht in wesentlichen Punkten, dem bereits in Figur 1 dargestellten und entsprechend beschriebenen Gefäß.

Es ist lediglich mit einer Abdeckung 28 versehen, die zwar für Sauerstoff durchlässig ist, jedoch Kontaminationen verhindert und demzufolge die Sterilität  
20 sichert. Außerdem kann mit einer solchen Abdeckung 28 das Austrocknen des Gefäßes 1 verhindert werden.

25 In Figur 5 ist außerdem erkennbar, daß sich der Füllstand  $F_H$  unterhalb der Gefäßhöhe  $G_H$  befindet.  $G_H$  gibt gleichzeitig den Abstand der Abdeckung 28 des Gefäßes 1 vom Boden wieder.

30 Durch die Abdeckung 28 wird der Sauerstoffgradient beeinflusst.

Dieser Sachverhalt ist in dem Diagramm, gemäß Figur 6 wiedergegeben und es wird deutlich gemacht, daß die Sauerstoffkonzentration zwischen Füllstandshöhe  $F_H$   
35 und Gefäßhöhe  $G_H$  ebenfalls einen bestimmten Sauer-

stoffkonzentrationsgradienten, der durch die Abdek-  
kung 28 hervorgerufen wird, bei Sauerstoffverbrauch  
durch Stoffwechselaktivität unterliegt.

5 Bei dem in Figur 7 gezeigten Beispiel ist ein Gefäß 1  
nach Figur 1 bzw. 5 in einem typischen Brutschrank 9  
aufgenommen worden, in dem bekanntermaßen besonders  
optimale Bedingungen für die Zellkultivierung einge-  
halten werden können. Unter optimalen Bedingungen  
10 wird allgemein eine Temperatur von ca. 37 °C, eine  
relative Luftfeuchtigkeit von 100 % bei normalem at-  
mosphärem Druck und einem Sauerstoffpartialdruck im  
Gasraum, der der Umgebungsluft entspricht, verstan-  
den. Die Lichtwellenleiter 6 für die beiden Sensor-  
15 membran 3 können aus dem Brutschrank 9 herausge-  
führt werden, so daß eine lokale Trennung von Meßort  
und Meßwerterfassung erreicht werden kann. In dieser  
Figur ist außerdem eine Gaszufuhr 10 für den Brut-  
schrank 9 dargestellt, durch die beispielsweise atmo-  
20 sphärische Luft mit entsprechendem konstantem Sauer-  
stoffgehalt nachgeführt werden kann. Brutschränke der  
beschriebenen Art werden standardgemäß zur Kultivie-  
rung von Zellen eingesetzt.

25 In der Figur 8 ist ein Beispiel für ein erfindungs-  
gemäß zu verwendendes Gefäß 1' dargestellt, das als  
Multiwellplatte, wie diese sehr häufig zur Kultivie-  
rung von Zellen mit einer Mehrzahl von Kavitäten 7,  
7' ausgebildet ist. In den Kavitäten 7, 7' sind je-  
30 weils wieder zwei Sensormembranen 3 und 3', wobei  
jeweils die Sensormembran 3' zusätzlich mit einer  
Oxidoreductase-Membran 4 versehen ist, analog zum  
Gefäß 1, wie es in Figur 1 beschrieben und gezeigt  
worden ist, angeordnet und ausgebildet.

Eine solche Multiwellplatte 1' kann wiederum in einem Brutschrank 9 aufgenommen werden und die Zellkulturen in den Kavitäten 7 entsprechend kultiviert werden. Im Brutschrank 9 kann unterhalb der Multiwellplatte 1' eine Halteplatte 8 angeordnet werden, mit der die Lichtwellenleiter 6 fixiert und positioniert werden können. Dabei sind die Lichtwellenleiter 6 an der Halteplatte 8 entsprechend der Anordnung der Sensormembranen 3 und 3' in den Kavitäten 7 und 7' des Gefäßes 1' gehalten. Die Halteplatte 8 kann dann im Brutschrank 9 in einem solchen Abstand zur Multiwellplatte 1' und hier insbesondere zu dessen Bodenfläche angeordnet werden, daß die Lichtstrahlen aus den Lichtwellenleitern 6 den gesamten Flächenbereich der jeweiligen, ihnen zugeordneten Sensormembranen 3 und 3' erfassen können. Die Verwendung der Halteplatte 8 erlaubt einen für die Zellkultivierung ungestörten Betrieb. Im Brutschrank werden die Zellen keiner weiteren Behandlung unterzogen. Zu solchen Zwecken wird die Multiwellplatte 1' aus dem Brutschrank und damit aus der Halterung 8 entnommen. Außerhalb des Brutschrankes kann dann die Behandlung der Zellkulturen im üblichen Sinne, wie z.B. Wechsel des flüssigen Mediums 2 oder Beobachtung der Zellen mit einem Mikroskop, ohne Einschränkung erfolgen.

Zumindest eine Kavität 7' einer solchen Multiwellplatte 1' kann für die bereits erklärte Referenzmessung verwendet werden, indem diese Kavität 7' ohne Zellen nur mit flüssigem Medium 2 befüllt wird.

In der Darstellung nach Figur 9 ist schematisch ein optischer Multiplexbetrieb, mit dem neben der zeit- auch eine orts aufgelöste Messung mehrerer Proben, die in verschiedenen Gefäßen 1 bzw. Kavitäten 7 und 7'

enthalten sind, möglich ist, gezeigt. Figur 9 zeigt damit einen komplexen Aufbau zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

5 Eine Anordnung aus Lichtquelle 20, Detektor 26, Linsen 23, 25, 27, Filtern 21, 24 und Strahlteilern 22, wie in Figur 4 dargestellt, ist in einer Sende- und Meßeinheit 13 außerhalb eines Brutschrankes 9 angeordnet. Das Anregungslicht wird aus dieser Sende- und  
10 Meßeinheit 13 über einen einzigen Lichtwellenleiter 12 in einen optischen Multiplexer 11, an dem weitere Lichtwellenleiter 6 angeschlossen sind, geführt. Der optische Multiplexer 11 führt das Fluoreszenzanregungslicht sequentiell durch die einzelnen Lichtwellenleiter 6 zur Fluoreszenzanregung zu den verschiedenen  
15 Sensormembranen 3 und 3'.

Das Fluoreszenzlicht der verschiedenen Sensormembranen 3 und 3' gelangt wieder über die Lichtwellenleiter 6 zum optischen Multiplexer 11 und wird von diesem wiederum sequentiell, den jeweiligen Meßorten, also den jeweiligen Sensormembranen 3 und 3' entsprechend dem jeweiligen Probengefäß 7 bzw. 7' über den Lichtwellenleiter 12 auf einen optischen Detektor,  
20 der in der Einheit 13 enthalten ist, gerichtet. Die so ermittelten Signale können entsprechend orts- und zeitaufgelöst, zur Bestimmung der jeweiligen Sauerstoffkonzentration und der Oxidoreductase-Substratkonzentration genutzt werden.

30 Von der Einheit 13 gelangen die erfaßten Meßwerte zu einer Auswerte- und Steuereinheit 14, hier ein Personalcomputer, mit dem die Auswertung der erfaßten Meßsignale und dabei insbesondere, der im allgemeinen  
35 Teil der Beschreibung bezeichnete Wertevergleich

durch Messung am Referenzgefäß 7' durchgeführt werden kann. Mit der Auswerte- und Steuereinheit 14 können aber auch die Sende- und Meßeinheit 13 sowie der optische Multiplexer 11 gesteuert werden.

5

Außerdem sind im Inneren des Brutschrankes 9 Sensoren 15 für die Erfassung von Temperatur, relativer Feuchtigkeit, dem Gasdruck und gegebenenfalls der chemischen Zusammensetzung mit jeweiligem Partialdruck der beteiligten Gase der Gasatmosphäre angeordnet. Die von den Sensoren 15 erfaßten Meßwerte werden wiederum über eine gesonderte Leitung 16 in die Sende- und Meßeinheit 13 und von dort in die Auswerte- und Steuereinheit 14 geleitet, so daß damit der im allgemeinen Teil der Beschreibung bezeichnete Wertevergleich durchgeführt werden kann. Es besteht aber auch die Möglichkeit, die Leitung 16 unmittelbar von den Sensoren 15 zur Auswerte- und Steuereinheit 14 zu führen. Anhand der Sensordaten kann, wie im allgemeinen Teil der Beschreibung dargestellt, die Sauerstoffsättigungskonzentration im Referenzgefäß 7' berechnet werden und damit der Werteausgleich erfolgen.

25

In der Figur 10 ist ein Beispiel zur gleichzeitigen Überwachung mehrerer Proben, die in einer Mehrzahl von Kavitäten 7 und 7' einer Multiwellplatte 1' enthalten sind, wiedergegeben. Dabei ist unterhalb der Multiwellplatte 1' eine fokussierende Linse 17 angeordnet, mit der zumindest der Teil der Multiwellplatte 1' auf dem die Membranen 3 und 3' angeordnet sind, einmal mit Anregungslicht bestrahlt und zum anderen, das jeweilige Fluoreszenzsignal als Abbildungen in ein hier als Lichtwellenleiterbündel 6' verwendeten Lichtleitsystems einkoppelbar ist, abgebildet und weitergeleitet werden kann.

35

Die Fluoreszenzsignal Anregung und Detektion an den Membranen 3 und 3' in den Kavitäten 7 und 7' kann dann beispielhaft, wie in Figur 11 gezeigt, erfolgen. Hierzu wird wieder Licht einer Lichtquelle 20, über  
5 eine Linse 27, einen Filter 21 und eine Einkoppeloptik 23 in mindestens einem Teil des Lichtwellenleiterbündels 6' eingekoppelt und auf die Membranen 3 und 3', die wie bereits mehrfach beschrieben, auf podestartigen Elementen 5 in den Kavitäten 7 und 7'  
10 angeordnet sind, gerichtet, wobei durch den Filter 21 nur Licht aus der Lichtquelle 20 einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge genutzt wird.

Das Fluoreszenzlicht der verschiedenen Membranen 3 und 3' gelangt wieder, wie hier schematisch dargestellt, aus dem anderen Teil des Lichtleiterbündels 6' über zwei Linsen 23, 25 und einen entsprechend geeigneten Filter 24 auf einen optischen Detektor 26', der hier eine für eine orts aufgelöste Messung  
20 geeignete Kamera ist. Damit kann wieder orts aufgelöst das Fluoreszenzsignal der einzelnen Membranen 3 und 3' der Kavitäten 7 und 7' erfaßt werden

In der Figur 12 ist ein weiteres Beispiel eines optischen Aufbaus für eine gleichzeitige Überwachung verschiedener Proben, die in mehreren Kavitäten 7 und 7' einer Multiwellplatte 1' aufgenommen sind, dargestellt.

30 Dabei wird wieder Licht einer Lichtquelle 20 über einen Filter 21 zur Fluoreszenzanregung auf die verschiedenen sauerstoffsensitiven Membranen 3 und 3' durch den Boden des Gefäßes 1', der zumindest im Bereich der podestartigen Elemente 5 transparent ausgebildet ist, gerichtet. Zur Strahlformung und Strahl-  
35

führung werden wieder verschiedene Linsen 27 und 29 sowie ein dichroidischer Strahlteiler 22 verwendet.

5 Das Fluoreszenzlicht der verschiedenen Membranen 3 und 3' gelangt über die Linse 29 durch den dichroidischen Strahlteiler 22 und gegebenenfalls einen geeigneten Filter 24 auf einen optischen Detektor 26', der hier wiederum eine für eine orts aufgelöste Messung geeignete Kamera 26' sein kann. Die Abbildung des  
10 Fluoreszenzlichtes kann mittels einer zusätzlichen Linse 25 auf die Kamera 26' erfolgen.

15

20

## Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Überwachung der Stoffwechselaktivität von in flüssigen Medien kultivierten Zellen, wobei diese in für den Stofftransport von Sauerstoff in das flüssige Medium (2) teilweise durchlässigen Gefäßen (1, 7) aufgenommen sind, bei dem die Sauerstoffkonzentration optisch mit Sensormembranen (3) im flüssigen Medium (2) zwischen den kultivierten Zellen und dem für den Sauerstofftransport in das flüssige Medium (2) maßgebend durchlässigen Teil des Gefäßes gemessen wird;  
und die im flüssigen Medium (2) gemessene Sauerstoffkonzentration mit einem in einem nur mit flüssigem Medium ohne Zellen befüllten Vergleichsgefäß (7') gemessenen Konzentrationswert und/oder mittels einer mit Meßwerten anderer Parameter berechneten Sauerstoffkonzentration einem Wertevergleich unterzogen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Temperatur des flüssigen Mediums (2) im Gefäß (1, 7) und/oder einem Vergleichsgefäß (7') bestimmt wird und die relative Feuchtigkeit und der Druck außerhalb der Gefäße (1, 7, 7') gemessen und mit den jeweiligen Meßwerten eine dem entsprechende Sauerstoffkonzentration berechnet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur des flüssigen Mediums (2) direkt in den Gefäßen (1, 7, 7') gemessen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß indirekt über die  
Umgebungstemperatur die Temperatur in den Gefä-  
ßen (1, 7, 7') gemessen wird.
- 5
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß bei variabler chemi-  
scher Zusammensetzung der Umgebungsatmosphäre  
der Gefäße (1, 7, 7'), deren Zusammensetzung mit  
den jeweiligen Stoffkonzentrationen bestimmt  
wird.
- 10
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß mit einem zweiten  
mit einer geeigneten Oxidoreductase (4) be-  
schichteten Sauerstoff-Sensormembran (3') in ei-  
ner Position zwischen den kultivierten Zellen  
und den für den Sauerstofftransport maßgebend  
durchlässigen Teil des Gefäßes im flüssigen Me-  
dium (2) die Konzentration des Substrates der  
Oxidoreductase im flüssigen Medium (2) bestimmt  
wird.
- 15
- 20
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet, daß die mit der ersten  
(3) und zweiten (3') Sauerstoffsensor-Membran in  
einem Gefäß (1, 7, 7') gemessenen Sauerstoffkon-  
zentrationen, zur Bestimmung der Oxidoreductase-  
Substratkonzentration miteinander in Beziehung  
gesetzt werden.
- 25
- 30
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Stoffwechselak-  
tivität der kultivierten Zellen über eine zeit-  
aufgelöste Messung der Sauerstoffkonzentration
- 35

mit dem daraus bestimmten Sauerstoffverbrauch der kultivierten Zellen und/oder der Oxidoreduktase-Substratkonzentrationsänderung überwacht wird.

5

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß an den Sensormembranen (3, 3') die Fluoreszenzintensität oder Fluoreszenzabklingzeit eines in den Sensormembranen (3) enthaltenen fluoreszierenden Stoffes, bei dem eine der Sauerstoffkonzentration entsprechende Fluoreszenzlöschung zu verzeichnen ist, gemessen wird.

10

15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sauerstoffkonzentration in flüssigen Medien (2) mehrerer Gefäße (1, 7, 7') orts aufgelöst gemessen wird.

20 11. Gefäß zur Überwachung der Stoffwechselaktivität von kultivierten Zellen in flüssigen Medien, das zumindest teilweise aus einem optisch transparenten Material besteht und teilweise für den Sauerstofftransport durchlässig ist und in dem  
25 mindestens eine Sensormembran zur optischen Messung der Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium angeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Sensormembran (3) oder (3') im Inneren des Gefäßes (1, 7, 7') zwischen den  
30 kultivierten Zellen und den für den Sauerstofftransport maßgebend durchlässigen Teil des Gefäßes im flüssigen Medium (2) angeordnet ist.

12. Gefäß nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Sensormembranen (3, 3' 4) an der Innen-  
wandung und/oder auf am Gefäßboden angeordneten,  
5 zumindest teilweise transparenten, podestartigen  
Elementen (5) aufgebracht sind.
13. Gefäß nach Anspruch 11 oder 12,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Öffnung des/der  
10 Gefäße(s) (1, 7, 7') mit einer sauerstoffperme-  
ablen Membran abgedeckt ist/sind.
14. Gefäß nach einem der Ansprüche 11 bis 13,  
dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Gefäße (7,  
15 7') in Form einer Multiwellplatte (1') ausgebil-  
det sind.
15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach  
einem der Ansprüche 1 bis 10,  
20 dadurch gekennzeichnet,  
daß über mindestens einen ersten Lichtwellenlei-  
ter (6) Licht einer nahezu monochromatischen  
Lichtquelle oder mit einem optischen Filter (21)  
entsprechend beeinflusstes Licht einer Lichtquel-  
25 le (20) mit einer Fluoreszenz anregenden Wel-  
lenlänge auf die Sensormembranen (3, 3') ge-  
richtet ist.
16. Vorrichtung nach Anspruch 15,  
30 dadurch gekennzeichnet, daß Fluoreszenzlicht  
über den ersten oder einen zusätzlichen zweiten  
Lichtwellenleiter (6) (über einen optischen Fil-  
ter (24)) auf einen optischen Detektor (26) ge-  
35 richtet ist.

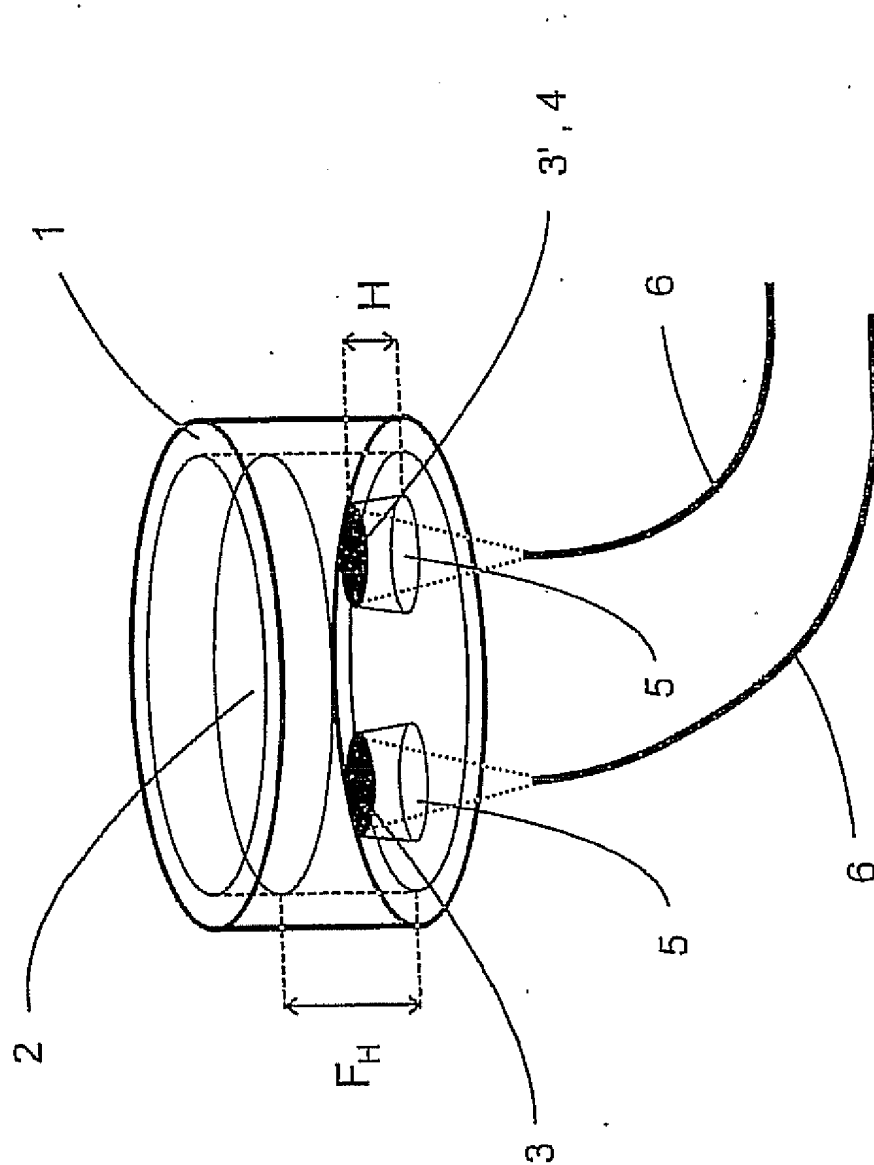
17. Vorrichtung nach Anspruch 15 oder 16,  
dadurch gekennzeichnet, daß den ersten und/oder  
zweiten, unterschiedlichen Sensormembranen zu-  
geordnete Lichtwellenleiter (6) mit einem opti-  
schen Multiplexer (11) verbunden sind und der  
Multiplexer (11) mit einer nahezu monochromati-  
schen Lichtquelle oder über einen Filter (21)  
mit einer Lichtquelle (20) und einem optischen  
Detektor (26) verbunden ist.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtwellenlei-  
ter (6) mittels einer Halteplatte (8) in bezug  
zu den Sensormembranen (3, 3') in den Gefäßen  
(1, 7, 7') positioniert sind.
19. Vorrichtung nach Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet, daß über einen abbilden-  
den Lichtwellenleiter (6'), ähnliche Lichtfüh-  
rungssystemen oder optischen Elementen (20, 21,  
22, 23 27, 29) Licht einer nahezu monochromati-  
schen Lichtquelle oder mit einem optischen Fil-  
ter (21) entsprechend beeinflusstes Licht einer  
Lichtquelle (20) mit einer Fluoreszenz anregen-  
den Wellenlänge auf die Sensormembran (3, 3')  
gerichtet ist.
20. Vorrichtung nach Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Sensormem-  
bran(en) (3, 3') mittels eines abbildenden  
Lichtleiters (6'), ähnlicher Lichtführungssyste-  
me oder optische Elemente (22, 24, 25, 29) be-  
trachtet und deren Abbildungen auf einer linea-  
ren oder flächenhaften Anordnung von lichttemp-  
findlichen Detektoren (26') gerichtet sind.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Gefäße (1, 7, 7') in einem Brutschrank (9) aufgenommen sind.

5

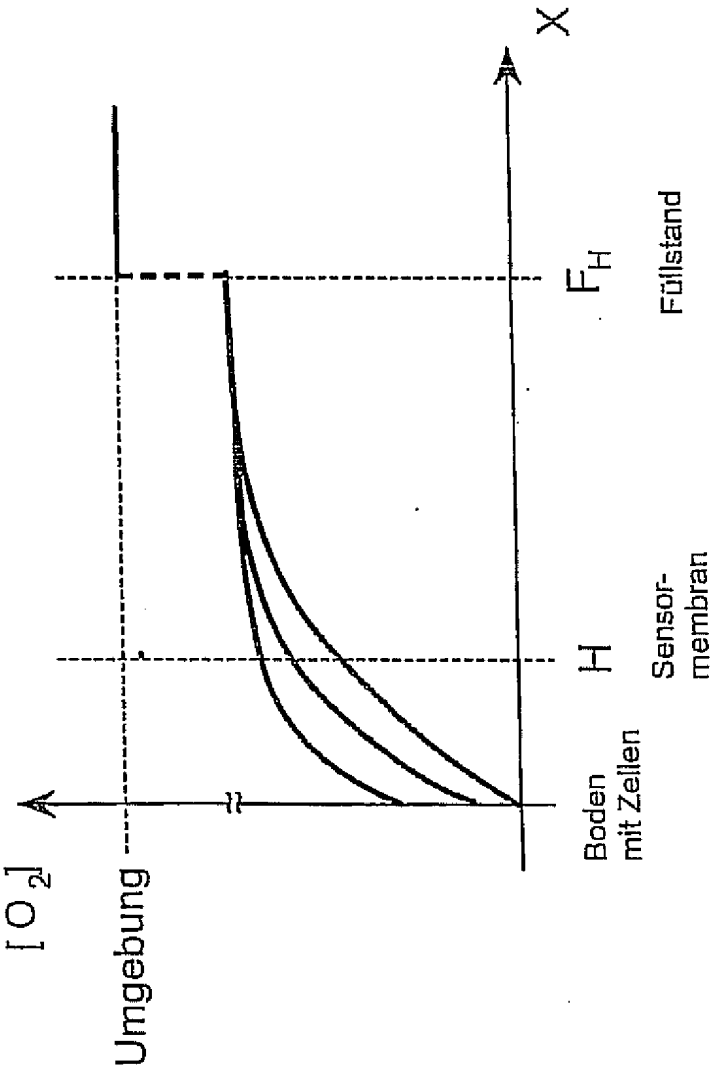
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß in unmittelbarer Nähe zu den Gefäßen (1, 7, 7') oder im Brutschrank (9) Sensoren (15) zur Bestimmung der Temperatur, der relativen Feuchtigkeit und des Druckes der Gasatmosphäre vorhanden sind.

10

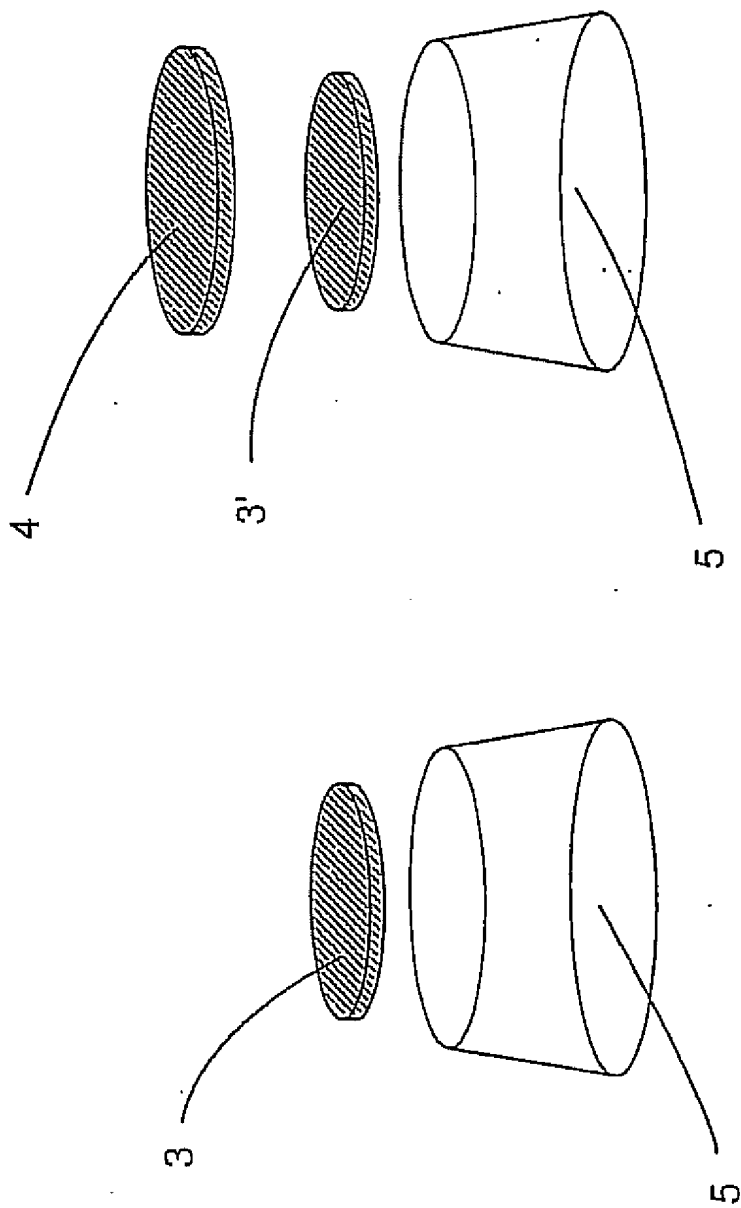


Figur 1

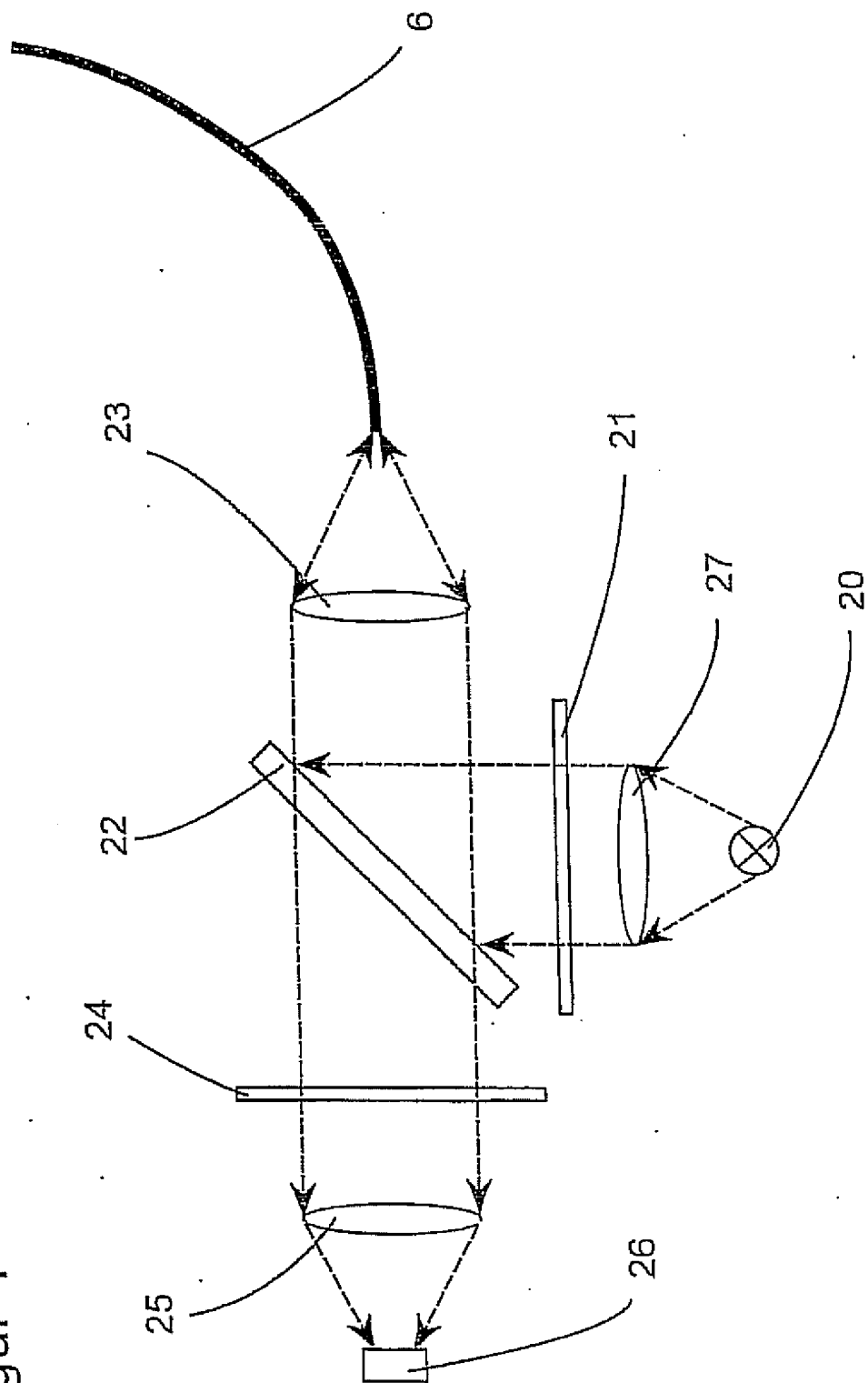
Figur 2

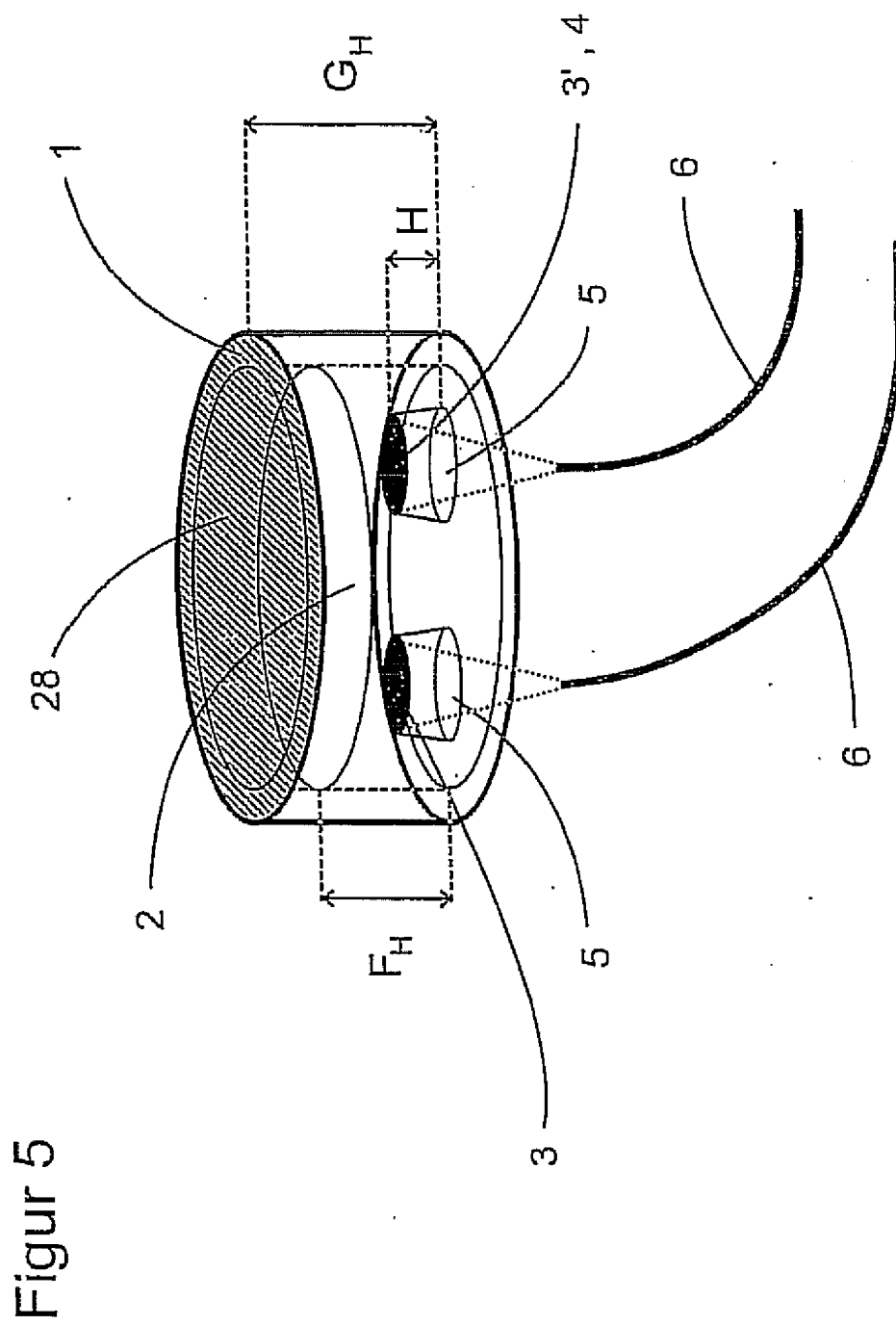


Figur 3

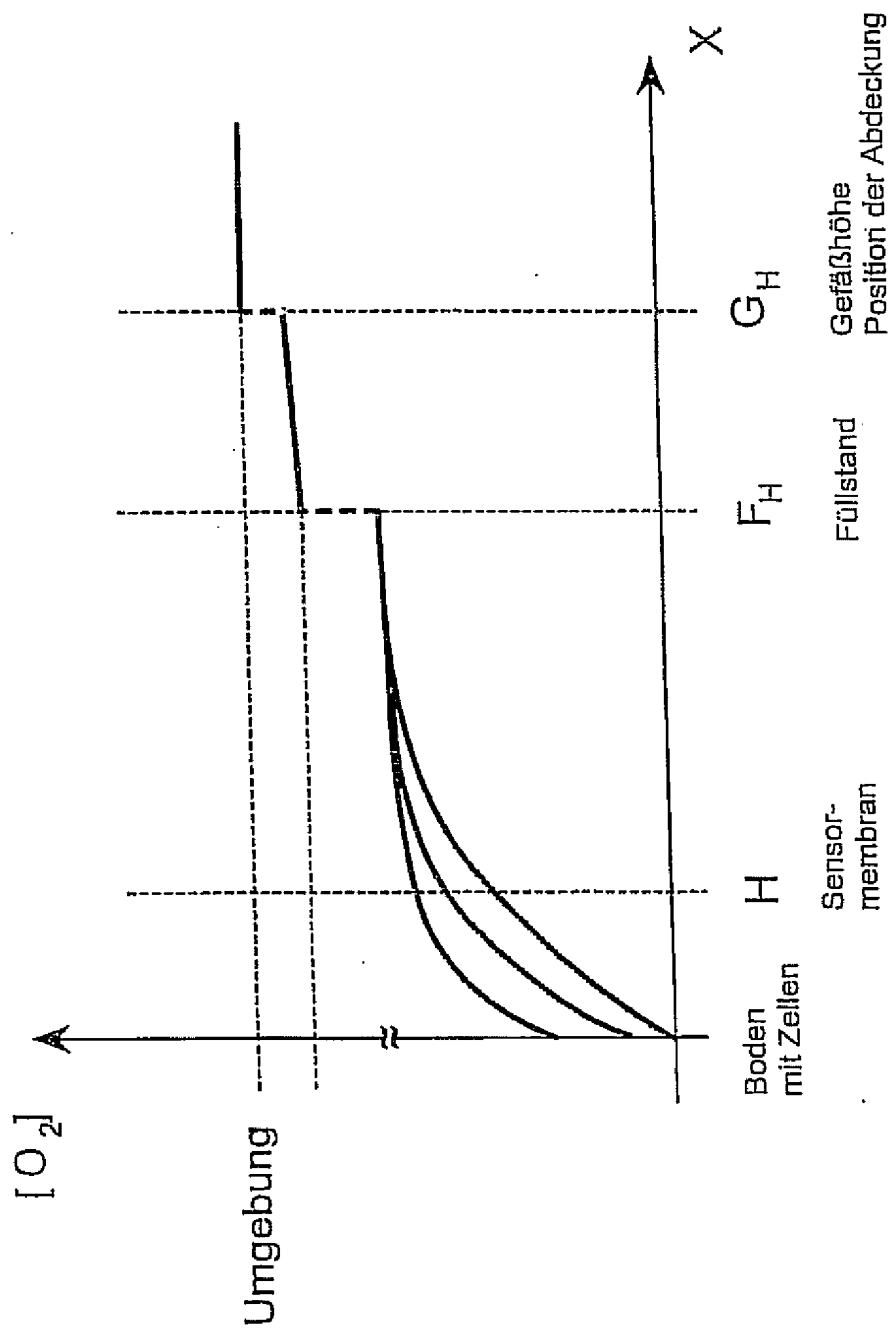


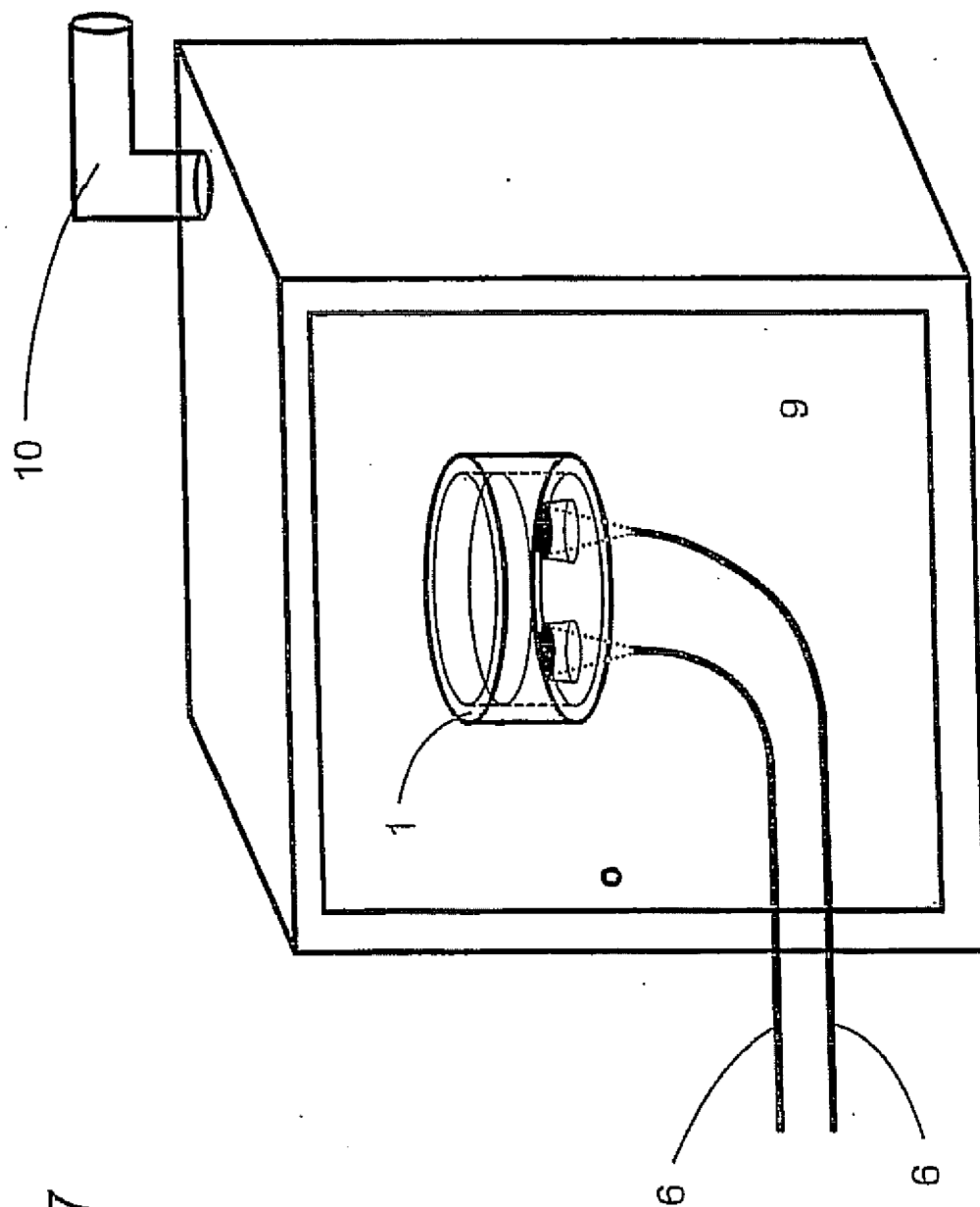
Figur 4



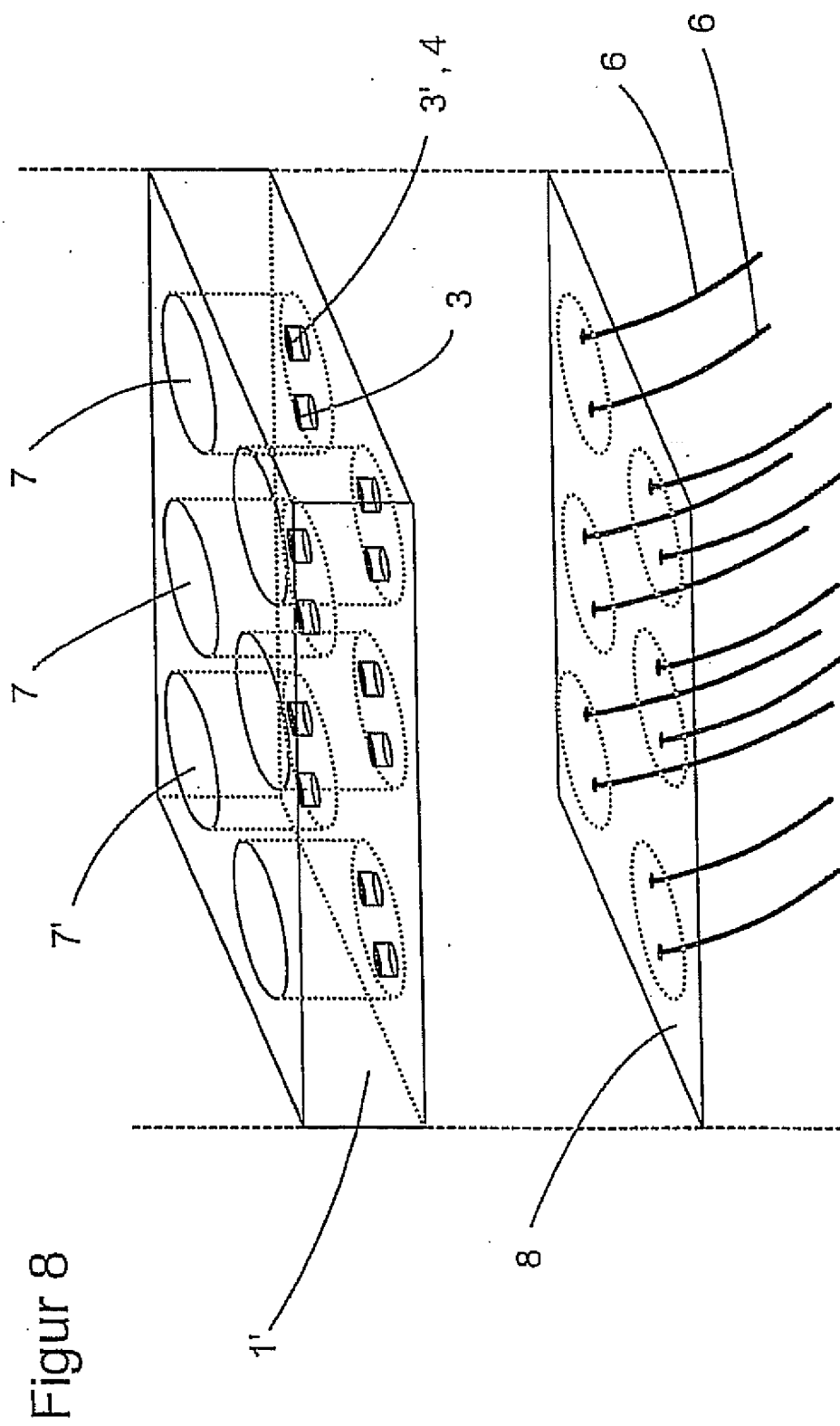


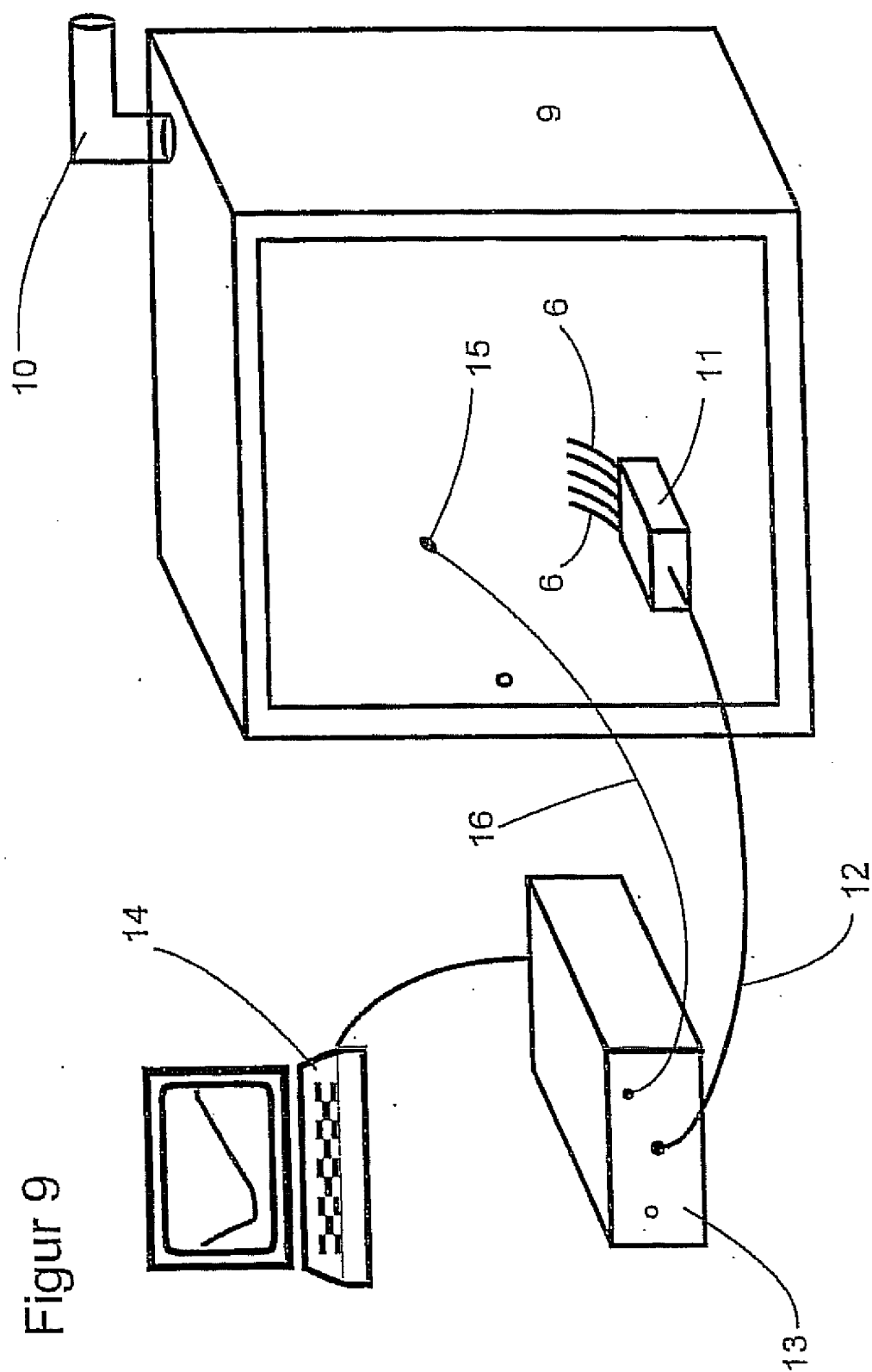
Figur 6





Figur 7





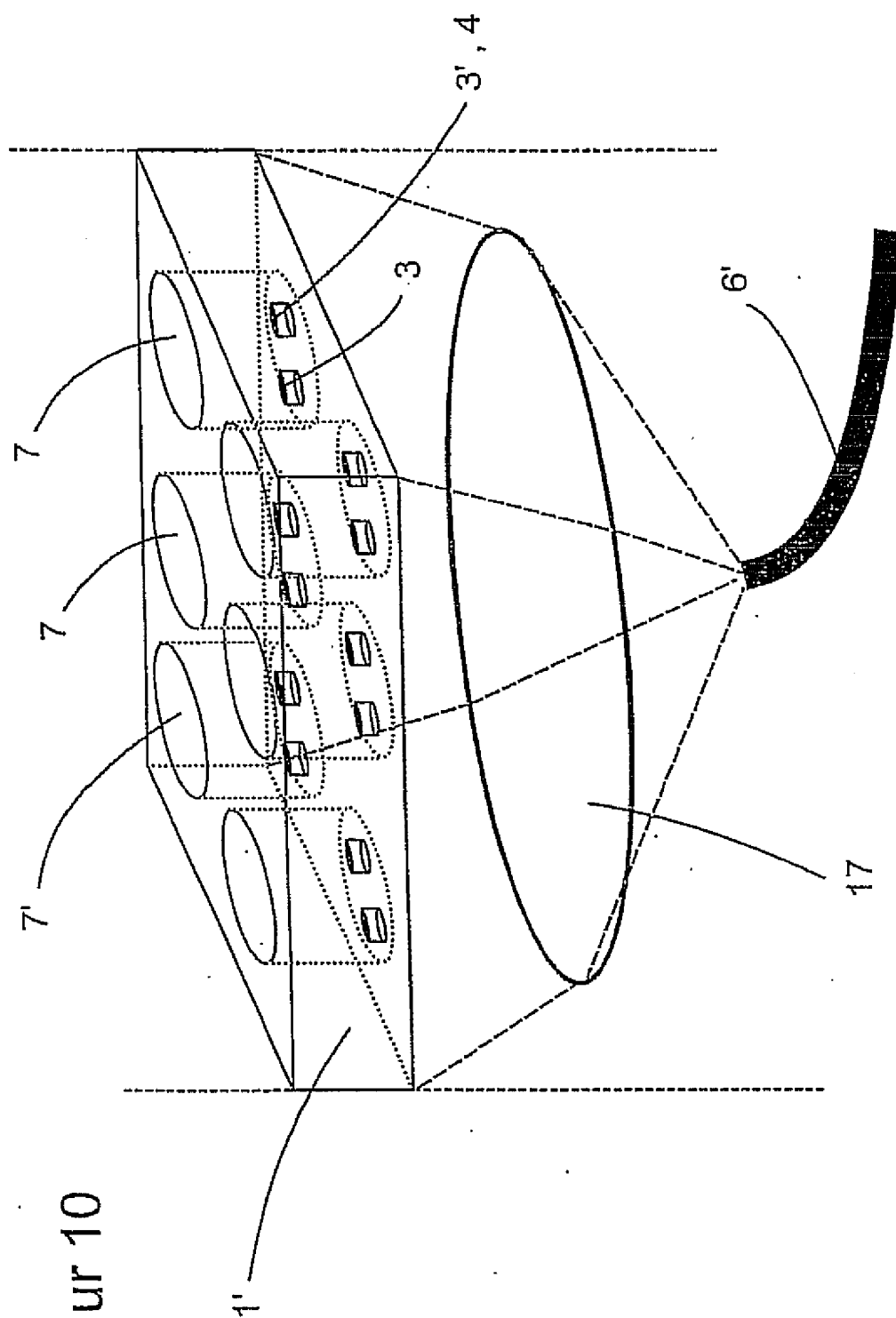
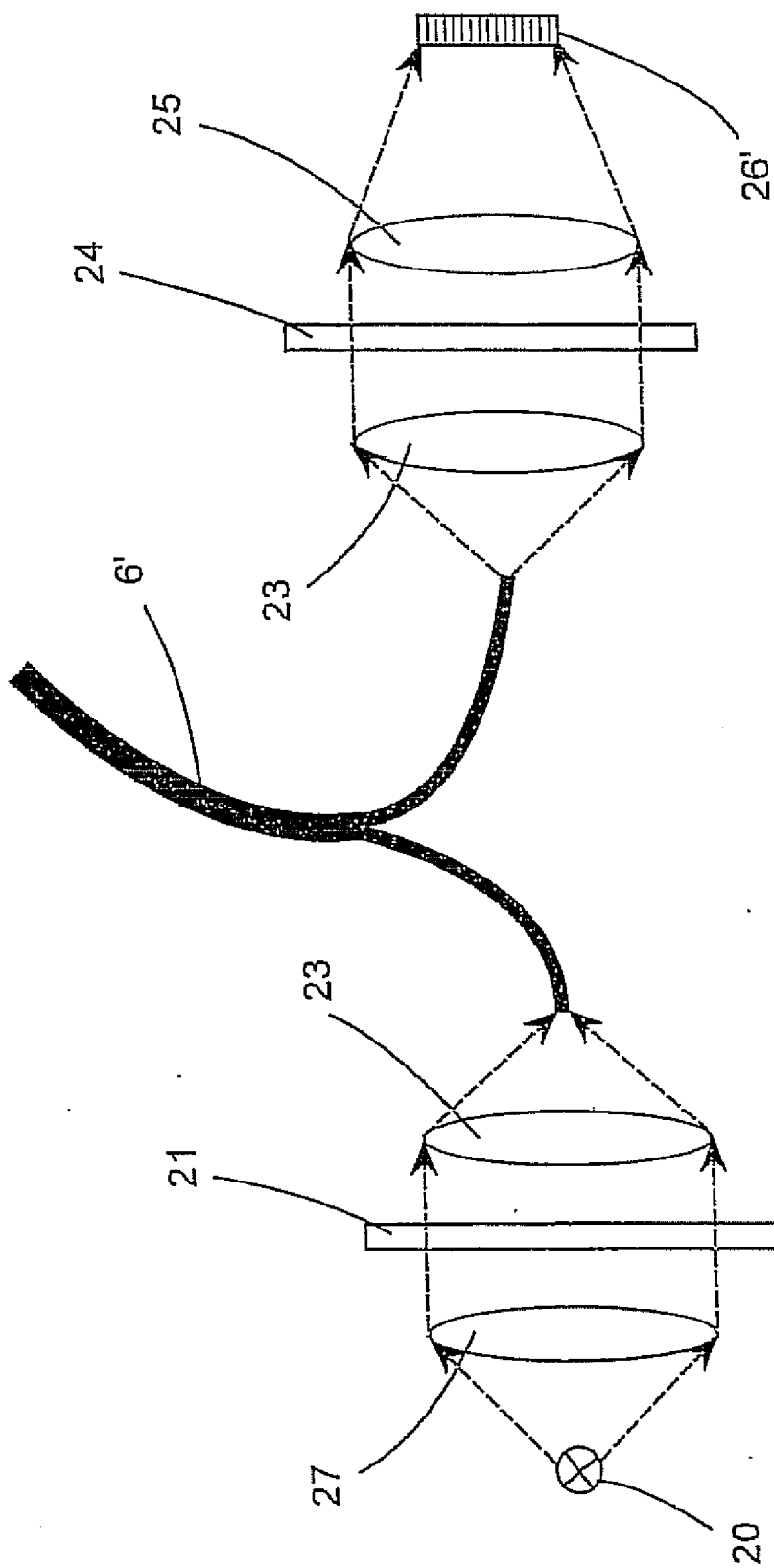
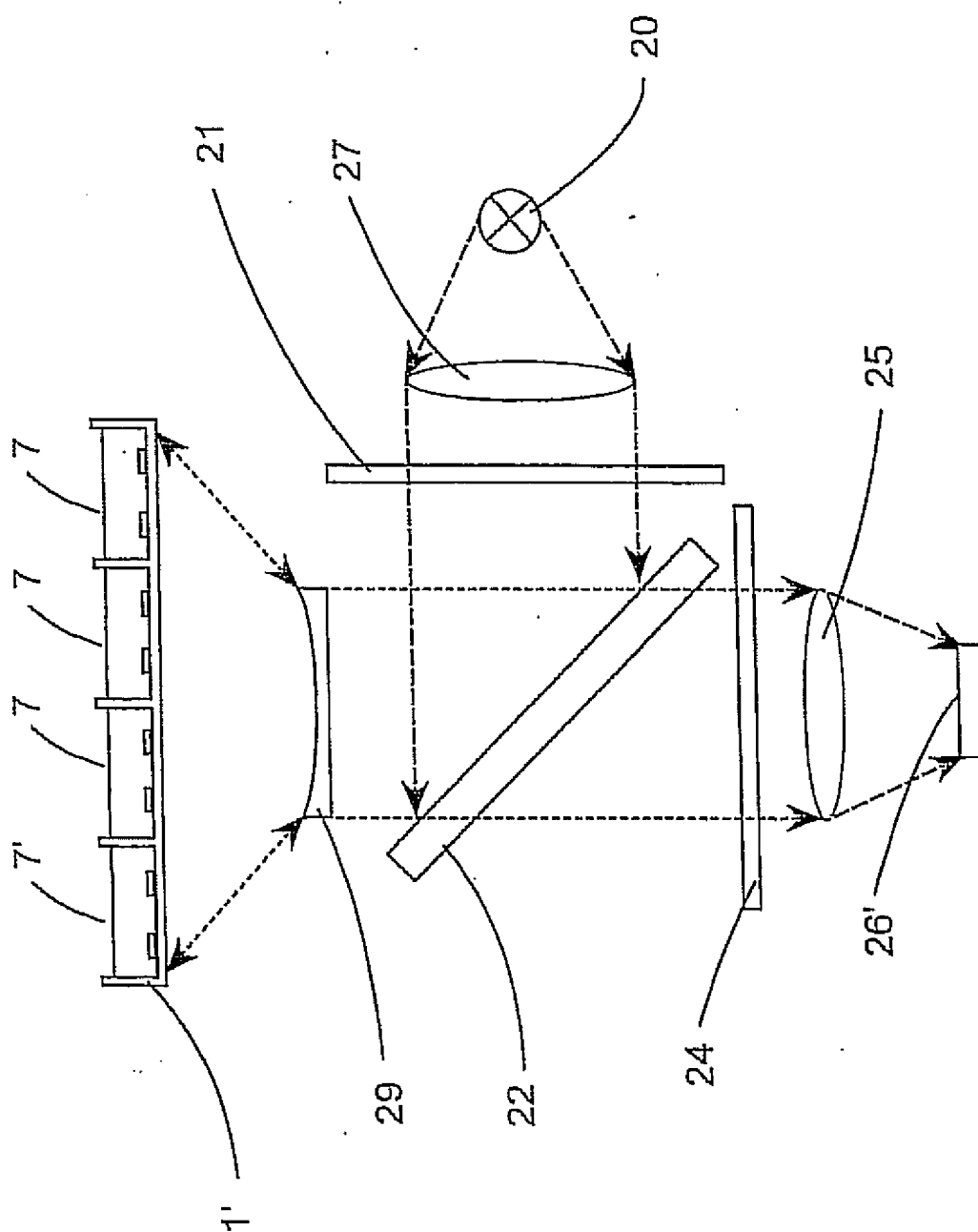


Figure 10

Figur 11





Figur 12



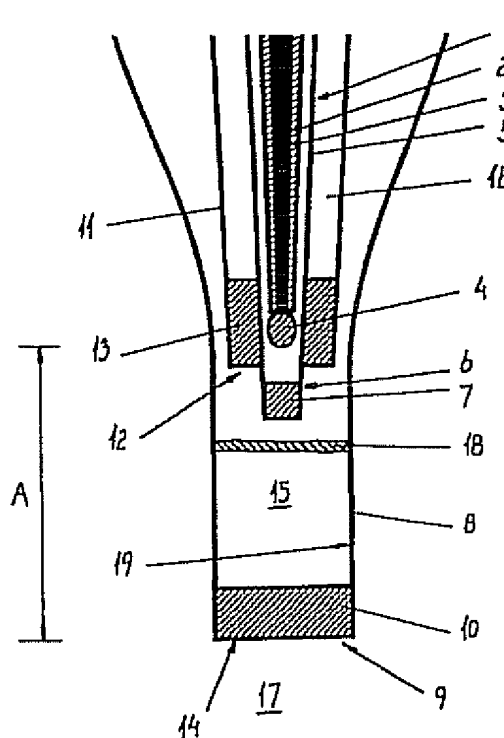
## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>G01N 27/30, 27/403</b>	<b>A1</b>	(11) International Publication Number: <b>WO 97/19345</b>
		(43) International Publication Date: <b>29 May 1997 (29.05.97)</b>
<p>(21) International Application Number: <b>PCT/DK96/00488</b></p> <p>(22) International Filing Date: <b>22 November 1996 (22.11.96)</b></p> <p>(30) Priority Data: <b>1313/95 22 November 1995 (22.11.95) DK</b></p> <p>(71)(72) Applicants and Inventors: <b>DAMGAARD, Lars, Riis [DK/DK]; Vesterbrogade 6B, DK-8000 Aarhus C (DK). REVSBECH, Niels, Peter [DK/DK]; Thorshavnsgade 3, DK-8200 Aarhus N (DK).</b></p> <p>(74) Agent: <b>PATRADE A/S; Store Torv 1, DK-8000 Aarhus C (DK).</b></p>		<p>(81) Designated States: <b>AL, AM, AT, AT (Utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, CZ (Utility model), DE, DE (Utility model), DK, DK (Utility model), EE, EE (Utility model), ES, FI, FI (Utility model), GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (Utility model), TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b></p> <p>Published With international search report. In English translation (filed in Danish).</p>

(54) Title: MICROSENSOR AND USE OF SUCH MICROSENSOR

## (57) Abstract

The invention relates to a microsensor for determining the concentration of a primary substrate by measuring the concentration of a secondary substrate. The microsensor comprises a transducer (1) for measuring the secondary substrate. The transducer (1) is surrounded by a first casing (8), which has an opening (9) with a barrier (10). The first casing (8) surrounds a second casing (11), also with an opening (12) with a barrier (13). In the first casing (8) between the barrier (10) in the first casing (8) and the barrier (13) in the second casing (11), a reaction space (15) is formed. In the reaction space (15) an environment with catalytic components is contained. By measuring the concentration of the secondary substrate, the presence of the primary substrate can be determined. In a preferred embodiment the microsensor is intended for measuring the presence of methane by using an oxygen microelectrode as a transducer. The primary substrate in this embodiment is methane, while the secondary substrate is oxygen.



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GD	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## MICROSENSOR AND USE OF SUCH MICROSENSOR

## INTRODOCTION TO THE DESCRIPTION

5

The present invention relates to a microsensor for measuring the concentration of a primary substrate in the surrounding environment which can be a fluid, a gas or a matrix, which microsensor comprises a first casing with an opening, which opening is in contact with a first barrier and a reaction space which borders on the first barrier, in which reaction space a catalytic material is located, a material intended to catalyse a conversion of the primary substrate with the concomitant conversion of a secondary substrate, and which microsensor furthermore comprises a transducer for the secondary substrate, which transducer is located at a distance from the first barrier.

15 Different types of biosensors for measuring the concentration and partial pressures of different primary substrates are known. J. Chem. Tech. Biotechnol. 44, 85-106 (1989) describes different methods and different sensors. However, the sensors described have various disadvantages. For measuring the concentration of the primary substrate, for instance methane, in an environment, it is necessary that the secondary substrate, for instance oxygen, is present in the environment in which the primary substrate is to be measured. Consequently, if the concentration of the secondary substrate is unknown or zero, it is not possible to measure the concentration of the primary substrate. Furthermore, it has been shown that in sensors depending on several substrates which are initially added to the reaction space, these substrates can be depleted or degraded.

25 Finally, the sensors described are not miniaturised, which leads to extensive diffusive distances and response times, and in-situ measurements is difficult.

European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 10, 235-243 (1980) describes a biosensor, comprising a first vessel containing a microbiological fluid in which measurements are to be made and a second vessel containing an electrolyte and cathodes and an anode submerged in the electrolyte. Between the first and the second

30

vessel two Teflon® membranes are placed, between which agar with immobilised *Clostridium butyricum* is deposited.

5 However, this sensor has several disadvantages. Measurements are very sensitive to whether sufficient stirring is established in the fluid, in which the measurements are to be made. Thus it is necessary to provide a constant stirring of the fluid. Furthermore, it is not possible to make in-situ measurements, as samples have to be taken for the measurement. Consequently, precise measurements over time are difficult to make and so are measurements with high spatial resolution. The necessity of stirring and the  
10 sensor construction in general makes the sensor unsuited for measurements at the location in question, for instance a bio-gas reactor.

Electroanalysis, 1 (1989) 305-309 describes a sensor type, comprising a silicon core, plated with silicon oxide on an outer and on an inner surface. The silicon core is furnished with gold electrodes and a chamber containing alginate. A gas permeable  
15 membrane is covering the gold electrodes and contains a reservoir containing immobilised bacteria. The gas permeable membrane makes a barrier between the chamber containing the alginate and the reservoir with the immobilised bacteria.

20 Due to the physical design of this sensor and other macroscopic sensors that consume an analyte in the process of measuring with a one-dimensional direction of diffusion, the role of a diffusive boundary layer will be significant, making such sensors very sensitive to the degree of stirring and thus unsuited for in-situ measurements. The sensor described above needs both the primary substrate, which is to be measured, and the  
25 secondary substrate to be present in the environment. The nutrition in the alginate in the sensor will further limit the use of the sensor as the bacteria will die, and CO<sub>2</sub>, which is the primary substrate for this sensor, will be released by the bacteria, affecting the measurement when the bacteria die, as the nutrition in the alginate is depleted by the bacteria.

30

The purpose of the present invention is to produce a biosensor, which is miniaturised, improving the properties of the sensor and enabling continuous (on-line) measure-

ments without a need to take out samples, which makes measurements with a high spatial resolution possible even in steep chemical gradients, and which is secured a constant supply of the secondary substrate for measuring the primary substrate in an environment. Thus the sensor is well suited for in-situ measurements.

5

This is achieved with a sensor, which is characterised by that the microsensor comprises a second casing, that the second casing is furnished with an opening in contact with a second diffusion permeable barrier, that the second barrier is established at a distance from the first barrier so that the reaction space is formed in the first casing  
10 between the first barrier and the second barrier, and that the second casing constitutes a source of the secondary substrate.

15

A sensor with these characteristics produces a sensor which is very precise and which without problems makes it possible in-situ to make very precise measurements and gradient measurements in the environment to be analysed, for instance a fluid, a matrix, or a gas, without the need for using for instance a pipette to take out samples. The second casing enables a constant supply of and measurement of a second substrate. Thus it is possible to make constant measurements of the primary substrate as mentioned above. The measurement of the second substrate is made in a position between  
20 the opening of the first casing and a face of the barrier of the second casing, which faces the interior of the second casing.

25

In experiments with the sensor according to the invention using methane as the primary substrate, interference from other compounds such as acetate, sulphide and ammonia was investigated. The experiments showed that these compounds have a negligible effect as only very high concentrations of sulphide was shown to have an effect.

30

Interference from different pH values in the fluid wherein the measurements were made was practically zero and deviated only as a consequence of using different buffers and of the different physical properties of these buffers. Results showed an interference of less than 4% between measurements at pH 7 and pH 10, respectively.

The temperature of the environment in which measurements are made will influence the measurements to some extent. Furthermore, the sensor cannot be used above the temperatures at which the chemical or biological components used in the reaction space will be inactivated.

5

If the secondary substrate is oxygen, the transducer is preferably a Clark-type oxygen microsensor, but other types, such as fibre-optic oxygen microsensors, may also be used. The barriers, produced in the openings of the first and second casing, are preferably made in silicone rubber. Ion-permeable materials may also be used. Hereby the use of the sensor can be expanded to comprise not only gasses, but also ions and other polar compounds, if the catalytic material in the reaction space is replaced by another catalytic material, for instance a different bacterial culture, capable of metabolising these compounds.

10

The measurements made with the sensor can be made in-situ and within a response time of below  $\frac{1}{2}$  minute. Thus a certain presence for instance of methane in for instance a fluid can be measure within a short time and can be measured continuously over a given period of time. Among other things, the response time depends on the distance between the transducer and the opening of the first casing.

20

The diffusive distance in the first casing from the opening of the first casing and inwards in the first casing can be limited by producing a so-called back guard, which can be electrochemical or of another type. A back guard is preferably placed in the first casing and consumes that part of the primary and/or secondary substrate, which is not consumed in the reaction space. Thus, the maximal diffusive distance for the substrates from the opening and inwards in the first casing will be the distance from the opening of the first casing to the back guard. A back guard of this type can be electrochemical, for instance a Clark-type element removing oxygen. Alternatively, the back guard functions by establishing a fixed concentration of the primary or secondary substrate. A back guard of this type can be for instance a gas phase, which inwards in the first casing replaces the aqueous medium, and which, due to its high capacity for assimilating gasses and high diffusivity of gasses, can provide a fixed background

25

30

concentration of the primary and/or the secondary substrate. In this case the back guard can be a so-called window, surrounding the transducer.

5 Experiments have shown that the sensitivity to stirring is less than 2%. Thus, the sensor according to the invention has no need for stirring. Furthermore, it is possible to produce sensors with a signal, which is linear in the partial pressure range 0 - 1 atm. methane and sensors with a sensitivity of below 0.001 atm. methane.

10 Alternatively, or as a supplement to the back guard, the microsensor according to the invention can be furnished with a so-called front guard. The purpose of the front guard is to establish a stable and controlled environment, for instance free of secondary substrate or other interfering compounds, around the opening of the first casing without preventing the diffusion of the primary substrate from the surrounding environment into the first casing. The front guard may be a third casing surrounding the first casing  
15 which has an opening with a barrier which is located at a distance from the first barrier, thus creating an additional space around the first casing. By placing for instance a bacterial culture which consumes the secondary substrate, for instance oxygen, but which does not consume the primary substrate, for instance methane, in the third casing, the secondary substrate, for instance oxygen, from the surrounding environment  
20 can be eliminated. However, the addition of a third casing will increase the physical dimensions of the sensor, which in turn increases the response time.

The sensor according to the invention is primarily intended for the measurement of ethanol, methanol, ammonium and methane in microbial ecology, medicine, and in the  
25 control of industrial processes, including waste water treatment plants. Industries producing measuring equipment and industries producing organic compounds in fermentors are suited areas for the use of the sensor according to the invention. Furthermore, the sensor is well suited for use in bio-gas reactors and laboratories.

#### DESCRIPTION OF THE DRAWING

30

In the following the invention will be described referring to the enclosed drawings, where

- Fig. 1 is a section through a possible schematic embodiment of a microsen-  
sor according to the invention,
- Fig. 2 is a section through an alternative schematic embodiment of a micro-  
sensor according to the invention,
- Fig. 3A is a section through a schematic illustration of a microsensor accord-  
ing to the invention
- Fig. 3B-3G are schematic illustration of courses of concentrations of a primary  
substrate and a secondary substrate,
- Fig. 4 is a curve illustrating the signal of a transducer as a function of the  
concentration of a primary substrate in the form of methane under  
stirring and not stirring, respectively, while measuring in fluid, and
- Fig. 5 is a curve illustrating the degree of interference from acetate, sulphide,  
and ammonia when measuring in fluid containing 0 and 1 atm. partial  
pressure of methane, respectively.

Fig. 1 illustrates an embodiment of the front part of a microsensor according to the  
invention. The microsensor comprises a transducer in the form of an oxygen micro-  
sensor 1, which in the shown embodiment is a Clark-type oxygen microelectrode. The  
Clark-type oxygen microelectrode includes a cathode 2. The cathode 2 has an exposed  
tip 4. The rest of the cathode is coated with a thin layer of electrically insulating ma-  
terial 3, preferably glass. The cathode 2 is enclosed in a tube 5. A tip 6 of the Clark-  
type oxygen microelectrode is mounted in a diffusion permeable barrier 7. A first  
casing 8, which in a preferred embodiment is made of glass, has an opening in the  
form of an orifice 9, which is in sealing contact with and encompassing a first barrier  
in the form of a first plug 10, which is made of silicone rubber. In the following, the  
first casing 8 will be referred to as the media casing.

A second casing 11, which is also made of glass in a preferred embodiment, surrounds  
the Clark-type oxygen microelectrode 1 inside the first casing 8. The second casing 11  
has an opening in the form of an orifice 12, which is in sealing contact with and en-  
compassing a second barrier in the form of a second plug 13. The Clark-type oxygen

microelectrode 1 is mounted in the second plug 13, which in a preferred embodiment is made of silicone rubber. The tip 6 of the Clark-type oxygen microelectrode 1 is situated at a distance A from a face 14 of the first plug 10 in the orifice 9 of the first casing 8. In the following, the second casing 11 will be referred to as the gas casing.

5

Between the second plug 13 and the first plug 10, subsidiary the orifice 12 of the gas casing 11 and the orifice 9 of the media casing 8, is provided a reaction space 15. The reaction space 15 is meant to hold a medium in the form of a liquid containing a catalytic material. The catalytic material can be a certain bacterial culture for the oxidation of the primary substrate which is to be measured. In the present embodiment methane is the substance to be measured. However, it is possible to use the microsensor according to the invention to determine the concentration of other primary substrates in the surrounding environment, which environment can be fluids, matrixes and gasses.

10

A space 16 between the Clark-type oxygen microelectrode 1 and the gas casing 11 contains a certain percentage, preferably an atmospheric percentage, of oxygen  $O_2$ . The oxygen can diffuse from the space 16 into the reaction space 15 through the second plug 13. The reaction space 15 contains bacteria in a buffered nutrient medium and can be sucked in to the reaction space by applying vacuum at the upper end (not shown) of the microsensor. Methane present in the surrounding environment in a location 17 outside the media casing 8, and which is to be measured, can diffuse into the reaction space 15 through the first plug 10.

20

In the reaction space 15 a reaction zone 18 will form (see Fig. 3A). The reaction zone 18 will form in the medium in the reaction space 15 and consists of bacteria cells that have multiplied. The reaction zone 18 extends as a disc with a circumference along an inner surface 19 of the media casing 8, along the media casing 8 and along a circumference of the media casing 8. The reaction zone 18 will form under the influence of equilibrium concentration gradients of oxygen and methane in the reaction space. The equilibrium gradients depend on the diffusional characteristics of the sensor components.

25

30

In a preferred embodiment the tip 6 of the oxygen microelectrode 1 has a diameter of  $1\mu\text{m}$  to  $250\mu\text{m}$ , preferably between  $1\mu\text{m}$  and  $100\mu\text{m}$ , most preferred between  $1\mu\text{m}$  and  $10\mu\text{m}$ .

5 Fig. 2 illustrates an alternative embodiment of the microsensor according to the invention. In the alternative embodiment the microsensor according to the invention is furnished with a third casing 21, which surrounds the first casing 8 in a similar fashion as the first casing 8 surrounds the second casing 11. The third casing 21 has an opening in the form of an orifice 22, which is in sealing contact with a third barrier in the  
10 form of a third plug 23 in a similar fashion as the orifice 9 of the first casing 8 is in sealing contact with the first plug 10. The third casing contains an electrochemical or biological trap for trapping for instance  $\text{O}_2$  and sulphide. The third casing constitutes a front guard. The microsensor is also furnished with a back guard 24 in the form of an electrode, which is placed between the first casing 8 and the second casing 11.

15

Fig. 3A-3D illustrate measurements of methane concentrations using the sensor according to the invention. In Fig. 3A is shown a crude schematic illustration of the Clark-type oxygen microelectrode 1, the media casing 8, the first plug 10, the gas casing 11, and the second plug 13. The reaction space 15 is located between the first  
20 plug 10 and the second plug 13.

A gradient of the concentration of  $\text{C}_{\text{CH}_4}$  of methane and a gradient for the concentration  $\text{C}_{\text{O}_2}$  of oxygen is illustrated in Fig. 3B-3D. For the purpose of illustration the concentration gradients are shown to be linear, and the effect of differences in diffusion  
25 coefficients in the medium contained in the reaction space 15 and in the plugs 10, 13 is thus not shown.

Other curves for the concentration gradients, linear as well as non-linear, may occur. In the case illustrated here it is assumed that the bacteria in the reaction zone consume  
30 all oxygen and all methane in the reaction zone. However, cases where not all oxygen and/or not all methane is consumed may occur. The curves for their concentration gradients will be different in such cases.

The measurement of the secondary substrate takes place at the distance A from the lower face 14 of the first plug 10 in a plane Q, where the tip of the Clark-type oxygen microelectrode 1 is located. The measurement is a measurement of the concentration  $C_{O_2}$  of oxygen in the plane Q.

Fig. 3B shows a measurement with a relatively high concentration  $C_{CH_4}$  of methane in the location 17 in the surrounding environment outside the media capillary 8. The concentration is shown as partial pressure in the figure. The concentration of methane decreases from a concentration at the lower face 14 of the first plug 10 through the first plug 10 and through the reaction space 15 being reduced to zero percent in the reaction zone 18. For this concentration of methane at the location 17 in the surrounding environment at the orifice 9 of the first casing 8, the reaction zone is located in a plane R as the ratio between the fluxes of methane and oxygen in this plane is the same as the ratio with which the two substrates participate in the methane oxidation reaction.

A concentration  $C_{O_2}$  of oxygen is shown as partial pressure in the figure. The concentration of oxygen decreases from a concentration in the gas casing 11 at the upper face 20 of the second plug 13 through the second plug 13 and through the reaction space 15 to zero percent in the reaction zone 18.

Fig. 3C shows a measurement with a relatively low concentration  $C_{CH_4}$  of methane in the location 17 in the surrounding environment outside the media casing 8. The concentration of methane decreases from a concentration at the lower face 14 of the first plug 10 through the first plug 10 and through the reaction space 15 being reduced to zero percent in the reaction zone 18. At this concentration of methane at the location 17 in the surrounding environment at the orifice 9 of the first casing 8, the reaction zone 18 is located at a plane S.

30

A concentration  $C_{O_2}$  of oxygen is shown as partial pressure in the figure. The concentration of oxygen decreases from a concentration in the gas casing 11 at the upper face

20 of the second plug 13 through the second plug 13 and through the reaction space 15 to zero percent in the reaction zone 18. It can be seen that the reaction zone 18, where the ratio of between the fluxes of methane and oxygen correspond to the ratio at which they participate in the reaction, has moved closer to the first plug 10. As a consequence, the concentration of oxygen measured by the Clark-type oxygen microsensor has increased.

Fig. 3D illustrates the same components as in Fig. 3B and 3C, but in Fig. 3D the measurement is done at the location 17 in a surrounding environment which does not contain methane. Consequently, only the concentration of oxygen is illustrated. The concentration  $C_{O_2}$  of oxygen decreases from a concentration in the gas casing 11 at the upper face 20 of the second plug 13, through the reaction space 15, and further through the first plug 10 to zero percent at the lower face 14 of the first plug 10. In the case illustrated here, the concentration decreases linearly. As there is no methane in the surrounding environment at the location 17 outside the first casing 8, the bacteria in the reaction zone 18 will not be active and not consume any oxygen. It can be seen that the concentration of oxygen measured by the Clark-type oxygen microsensor has increased further compared to in Fig. 3B and 3C.

As mentioned, the measurement of the concentration  $C_{O_2}$  of oxygen takes place in a plane perpendicular to the longitudinal direction L. In Fig. 3B a measurement corresponding to the arrow  $P_B$  will be made, in Fig. 3C a measurement corresponding to the arrow  $P_C$  will be made, while in Fig. 3D a measurement corresponding to the arrow  $P_D$  will be made. By a calibration of the sensor according to the invention in external media with a known concentration of methane, the signal from the Clark-type oxygen microsensor can be translated into a measure of the concentration  $C_{CH_4}$  of methane in the surrounding environment. That, among other things, makes it possible to calibrate the microsensor. Fig. 3B and 3C show that the plane R, subsidiary S, in which the reaction zone is located will be dislocated when the concentration of methane  $C_{CH_4}$  in the surrounding environment at the location 17 is changed.

Fig. 3E, Fig. 3F, and Fig. 3G illustrate the gradients of the concentrations of methane  $C_{CH_4}$  and oxygen  $C_{O_2}$  in cases, where it is not possible for the reaction zone to move as a response to a change in the concentration of methane  $C_{CH_4}$ . For the purpose of illustration the concentration gradients decrease linearly and the differences in diffusion coefficients in the medium in the reaction space 15 and in the plugs 10, 13 is thus not accounted for.

Fig. 3E shows a measurement corresponding to a measurement as shown in Fig. 3B with a relatively high concentration  $C_{CH_4}$  of methane in the surrounding environment at the location 17 outside the media casing 8 as in Fig. 3C. The concentration is shown as partial pressure in the figure. The relatively high concentration  $P_m^c(3)$  of methane is applied for the initial enrichment of the methane consuming bacterial culture. At this relatively high concentration of methane at the location 17 in the surrounding environment at the orifice 9 of the first casing 8, the reaction zone is located in a plane T.

Fig. 3F shows a measurement corresponding to a measurement as shown in Fig. 3C with the same relatively low concentration  $C_{CH_4}$  of methane in the surrounding environment at the location 17 outside the media casing 8 as in Fig. 3C. The concentration is shown as partial pressure. The concentration of methane decreases from a concentration  $P_m(3)$  at the lower face 14 of the first plug 10 through the first plug 10 and through the reaction space 15, being reduced to zero percent in a plane below the plane T, where the reaction zone is located.

Correspondingly, the concentration of oxygen in the figure is shown as a partial pressure  $P_o(s)$ . The concentration of oxygen decreases from a concentration  $P_o(1)$  in the gas casing 11 at an upper face 20 of the second plug 13 through the second plug 13 and through the reaction space 15 to zero percent in the plane below the plane where the reaction zone is located.

Fig. 3G shows a measurement at the same concentration  $C_{CH_4}$  of methane in the surrounding environment at the location 17 outside the media casing 8 as in Fig. 3F. The

concentration is shown as partial pressure in the figure. The concentration decreases from a concentration  $P_m(3)$  at the lower face 14 of the first plug 10 through the first plug 10 and through the reaction space 15 being reduced to zero percent in the reaction zone 18. For this concentration of methane in the surrounding environment at the location 17 by the orifice 9 of the first casing 8, the reaction zone 18 is located in the plane T, which is the same plane as in Fig. 3E and Fig. 3F.

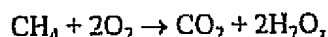
Correspondingly, the concentration of oxygen is shown as partial pressure. The concentration of oxygen decreases from a concentration  $P_o(1)$  in the gas casing 11 at an upper face 20 of the second plug 13 through the second plug 13 and through the reaction space 15 to a certain percentage, but not zero percent, in the reaction zone 18. From the reaction zone 18 and further through the reaction space 15 the concentration of oxygen decreases with a less steep gradient than the gradient from the gas casing to the reaction zone.

Fig. 3F and Fig. 3G shows that the transducer signal, illustrated by the arrows, is independent of the plane in which the reaction zone 18 is located. The transducer signal is only dependent on the concentration  $C_{O_2}$  of oxygen and the concentration  $C_{CH_4}$  of methane and of the diffusional characteristics of the sensor components, which are fixed physical values.

In the following, the principle for measurements with the microsensor according to the invention will be described in further detail referring to the mathematical basis for the measurements with the microsensor according to the invention.

The methane microsensor principle is based on a counter-diffusion principle where methane oxidising bacteria in the reaction space consume oxygen from the gas capillary when the sensor tip is exposed to methane. This oxygen consumption results in a lowering of the oxygen tension inside the reaction space, which is sensed by the internal oxygen microsensor. In contrast to the new calibration method, this procedure leads to some scatter due to inaccuracies during gas sampling and storing for subsequent analysis. The response is linear and very stable over time and this fact gives a

hint on the detailed functioning of the sensor. If the response was closely related to the physiological state and motility of the methane oxidizing bacteria it might be expected to change over time as a function of time dependent changes in the bacterial population. But once the signal reaches stability after some days of enrichment the signal often stays practically on the same level for the rest of its lifetime, which so far has been more than 3 months. This can be explained by fig. 3E-3G: as the sensor is exposed to a methane partial pressure,  $P_m^*$  during enrichment the micro-organisms multiply, making the methane oxidizing activity more intense, locally depleting the oxygen or methane until methane oxidation only can occur in a zone at a distance a from the gas phase in the gas capillary, a zone where both substances are supplied by diffusion. The sizes of these diffusional fluxes must match the stoichiometry of the methane oxidation reaction:



15

for simplicity ignoring the fraction of carbon from methane that is incorporated into biomass. If the bacteria can concentrate their activity into a very narrow zone, the relationship between the steady-state diffusional fluxes of oxygen and methane in the reaction space,  $J_o$ , and  $J_m$ , can be described by Fick's 1. law, assuming a one-dimensional diffusion model of the sensor and for simplicity assuming identical diffusional properties in water and silicone rubber:

$$J_o = 2 \cdot J_m$$

$$\Downarrow$$

$$-D_o \cdot \frac{-C_o(1)}{(1)} = 2 \cdot -D_m \cdot \frac{-C_m(3)}{l-a}$$

25

30

where  $C_o(1)$  and  $C_m(3)$  are the concentrations of oxygen at position 1 and methane in position 3, respectively, and  $l$  is the combined length of the diffusion paths, i.e. the length of the reaction space plus the lengths of the two silicone membranes.  $D_o$  and  $D_m$  are the diffusion coefficients in the sensor of oxygen and methane, respectively.

Using the relationship between concentration (C), solubility ( $\alpha$ ), and partial pressure (P),  $C = \alpha \cdot P$ , and substituting this into equation 1 yields:

$$5 \quad \frac{D_o \alpha_o \cdot P_o(1)}{a} = 2 \cdot \frac{D_m \alpha_m \cdot P_m^e(3)}{1-a} \quad (2)$$

From simple geometric considerations, the, following relationship is obvious:

$$10 \quad \frac{P_m^e(3)}{a-p} = \frac{P_o(1)}{a} \quad (3)$$

where p is the distance between the gas space and position s and  $P_o^e(s)$  is the partial pressure of oxygen at position s. Position s is the position of the tip of the internal oxygen sensor (see fig. 1). Solving equation (2) for a and substituting into equation (3) yields the following expression for the partial pressure at the tip of the internal oxygen sensor at the end of enrichment:

$$20 \quad P_o^e(s) = -2 \cdot \frac{D_m \alpha_m}{D_o \alpha_o} \cdot \frac{p}{1} \cdot P_m^e(3) + P_o(1) \cdot \left[ 1 - \frac{p}{1} \right] \quad (4)$$

If the sensor after enrichment is exposed to a lower partial pressure of methane,  $P_m(3)$ , during calibration and measurements, the bacteria might be able to move to a new location where both oxygen diffusing from the gas capillary and methane diffusing from the sensor tip are completely consumed, or the bacteria are not immediately motile and will consume all methane diffusing in from the tip in the same zone as where the enrichment took place, whereby not all of the oxygen diffusing from the gas capillary can be consumed.

If the cells are perfectly motile and consume all of both oxygen and methane in a new position, the situation is equivalent to the enrichment situation yielding the following expression for the oxygen partial pressure at the tip of the internal oxygen sensor with completely motile methane oxidation capacity:

$$40 \quad P_o(s) = -2 \cdot \frac{D_m \alpha_m}{D_o \alpha_o} \cdot \frac{p}{1} \cdot P_m(3) + P_o(1) \cdot \left[ 1 - \frac{p}{1} \right] \quad (5)$$

If the cells are fixed in the enrichment zone, the following expression describes the steady-state fluxes of oxygen and methane.

$$J_o^{1,2} - J_o^{2,3} = 2 \cdot J_m \quad (6)$$

where  $J_o^{1,2}$  and  $J_o^{2,3}$  are the fluxes of oxygen in the zones between the gas phase and the enrichment zone, and between the enrichment zone and the sensor tip, respectively. Using Fick's 1. law of diffusion and substituting solubilities times partial pressures for concentrations yields:

$$D_o \alpha_o \frac{P_o(2) - P_o(1)}{a} - D_o \alpha_o \frac{-P_o(2)}{1-a} = 2 \cdot D_m \alpha_m \frac{-P_m(3)}{1-a} \quad (7)$$

15

From geometrical reasons the following relation exists between the partial pressures of oxygen at positions 1, 2 and s:

$$\frac{P_o(s) - P_o(1)}{a-p} = \frac{P_o(1) - P_o(2)}{a} \quad (8)$$

20

Solving equation (7) for  $P_o(2)$  and substituting into equation (8) yields the following expression for a fixed methane oxidation capacity:

$$P_o(s) = -2 \cdot \frac{D_m \alpha_m}{D_o \alpha_o} \cdot \frac{p}{1} \cdot P_m(3) + P_o(1) \cdot \left[ 1 - \frac{p}{1} \right] \quad (9)$$

25

Comparing equations (5) and (9) shows that  $P_o(s)$  is the same whether or not the methane oxidation capacity is fixed at the enrichment zone. This may be the explanation for the reproducibility of the calibration curves even when the sensor is used under varying concentration ranges that might give rise to changes in the position of the active bacterial population. Furthermore, the model predicts the signal to be a linear function of the methane at the sensor tip,  $P_m(3)$  as the signal of the internal oxygen-sensor is proportional to  $P_o(s)$ .

30  
35

The model presented above describes situations with no oxygen in the external medium ( $P_{O_2} = 0$ ) and it assumes that diffusivities of oxygen and methane are identical in silicone rubber and in aqueous media and that the oxidation zone is infinitely narrow. Furthermore, the oxygen consumption of the internal oxygen microsensor is assumed to be negligible. Neither of these assumptions are realistic, but a similar but more complex mathematical model for a broader oxidation zone still predicts linearity, and independence of both the width and the position of the methane oxidation zone is predicted for diffusivities that vary in silicone and aqueous media if the ratio of the diffusion coefficients of oxygen and methane is constant throughout the sensor. The actual width of the oxidation zone is not resolved here, but as some sensors have a linear response up to a methane partial pressure of 1 atmosphere with a reaction space length of 150 microns, the width of the methane oxidation zone when the sensor is exposed to a methane partial pressure of a fraction of an atmosphere must be only a corresponding fraction of the reaction space length or less, assuming a constant specific reaction rate.

Due to the miniaturisation of the sensor, it is almost insensitive to stirring in the surrounding environment, and is thus well suited for in-situ measurements.

Fig. 4 is a graphical illustration of a series of experiments investigating the sensitivity of the sensor to stirring in the surrounding environment in which the measurements are performed. In the experiments the measurements are made in a fluid containing methane. The partial pressures of methane in the fluid are shown on the abscissa, the left ordinate shows the measured signal, and the right ordinate shows the stirring effect as a percentage of the maximal change in signal from 0 to 100% methane. The series of points marked 'a' show the signal in non-stirred fluid, the series of points marked 'b' show the signal in stirred fluid, and points marked 'c' show the effect of stirring.

The graph shows an increase in the effect of stirring in the range 0 - 0.3 atm. partial pressure of methane, while the effect of stirring decreases at higher partial pressures. In general, the effect of stirring is below 2% for the experiments.

Fig. 5 graphically illustrates the result of a series of experiments investigating the sensor sensitivity to interference from other substances than methane, namely acetate ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), sulphide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), and ammonia ( $\text{NH}_3$ ). These substances were chosen because they occur in sediments and bio-gas reactors, which are some of the main areas for use of the sensor according to the invention. The concentration of acetate, sulphide, and ammonia is shown on the abscissa, and the sensor signal is shown on the ordinate. The graph comprises a first upper set of curves corresponding to concentrations of acetate, sulphide, ammonia at a methane partial pressure of 0 and a lower set of curves corresponding to concentrations of acetate, sulphide, and ammonia at a methane partial pressure of 1 atm. The experiments with acetate and sulphide are performed in phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) buffer pH 7, while the experiments with ammonia is performed in a glycine ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) buffer pH 10.

The graph shows that the sensor sensitivity to interference from the three compounds is practically zero except for some sensitivity to sulphide at high concentrations. This interference can be compensated for using the aforementioned front guard.

The invention is described in Fig. 1 and Fig. 3A-3G referring to a specific embodiment of a microsensor. However, the design of the sensor can be different. Furthermore, the experiments illustrated in the graphs should not be considered a exhaustive description of the properties of the microsensor.

The present invention also relates to a microsensor for measuring a substrate in an surrounding environment such as a fluid, a gas or a matrix. The microsensor comprises a reaction space containing biologically active or catalytic material for consumption or conversion of the substrate with the concomitant consumption of a cofactor, a diffusion permeable outer barrier delimiting the reaction space, and a detector of the cofactor positioned at a certain distance from the outer barrier,

A sensor of this type is known from Electroanalysis, 1 (1989) 305-309. The reaction space in the sensor described there contains an alginate matrix containing bacteria, which assimilate  $\text{CO}_2$  thereby using oxygen as a cofactor. The reaction space is sur-

rounded by a diffusion permeable membrane enclosing the space. The membrane enables diffusive transport of  $\text{CO}_2$  and oxygen into the reaction space. Below the reaction space a Clark-type polarographic oxygen detector is constructed. The entire structure is made on a silica wafer using photo-lithographic processes.

5

The concentration of  $\text{CO}_2$  in the surrounding environment determines the diffusive flux of  $\text{CO}_2$  into the reaction space, which in turn determines the oxygen consumption. The oxygen consumption in the reaction space reduces the flux of oxygen, which likewise diffuses from the surrounding environment through the reaction space down  
10 to the oxygen detector. The signal from the oxygen detector thus decreases with an increase in the  $\text{CO}_2$  concentration in the surrounding environment.

15

The known sensor has the disadvantage, however, that both the substrate to be measured ( $\text{CO}_2$ ) and the cofactor ( $\text{O}_2$ ) have to be present in the surrounding environment to make a measurement possible. Furthermore, a variation in concentration of the cofactor in the surrounding environment will cause variations in the signal even if the concentration of the substrate to be measured is unchanged.

20

According to the invention as stated in claim 11, these disadvantages are eliminated by the facts that the reaction space is enclosed in a casing of a non-permeable material with an opening in which the outer barrier is placed, that the microsensor comprises a non-permeable second casing adjacent to the reaction space, that the cofactor is present in a reservoir in the second casing, that the second casing has a connecting opening between the reservoir and the reaction space, that the connecting opening is located at  
25 a distance from the outer opening, that a diffusion permeable middle barrier is placed in the connecting opening, and that the detector is placed in the reaction space or in the middle barrier.

30

The presence of the cofactor in an internal reservoir in the sensor makes it more universally applicable as it can measure the substrate in question even in environments where the cofactor is not present. Furthermore, the sensitivity to variations in the cofactor concentration in the surrounding environment is decreased, as the internal co-

factor up to a certain limit will supply the main contribution to the reaction in the reaction space. Thus the sensor is well suited for in-situ measurements in process reactors, for instance sewage treatment plants, where there is some variation in the composition of the surrounding environment. A sensor with these characteristics is very accurate and it can be made with such small dimensions that it can be used for measurements of gradients in the environments to be analysed. A very high spatial resolution in even very steep chemical gradients can be achieved.

By furnishing the sensor with a encompassing guard casing, as stated in claim 12, and a trap for the cofactor, which allows the substrate to be measured to pass, the sensitivity to the presence of the cofactor in the surrounding environment can be further decreased. This introduces the minor disadvantage that the increased distance of diffusion for the substrate to be analysed causes the response time of the sensor to increase to a certain extent, which, however, is not of great importance in practice. The trap or guard measures for the cofactor can with advantage be chosen as stated in claim 13 or 14.

A further stabilisation of the working properties sensor of the sensor can be achieved, if the sensor, as stated in claim 15, is furnished with a reservoir or diversion space which can assimilate surplus cofactor or products of the reaction or conversion from the process taking place in the reaction space. The opening to the diversion space will to a large extent function as a concentration fix point for the diffusion processes taking place in the sensor. Preferable embodiments are stated in claims 16 to 18.

Two preferred embodiments of the sensor are stated in claim 19 and 20. During experiments with a methane sensitive sensor as stated in claim 20, where the cofactor is oxygen, interference from other compounds such as acetate, sulphide, and ammonia was investigated. The experiments showed that interference from these compounds is negligible, only very high concentrations of sulphide had some effect.

Interference from different pH values in the fluid wherein the measurements were made was practically zero and deviated only as a consequence of using different buff-

ers and of the different physical properties of these buffers. Results showed an interference of less than 4% between measurements at pH 7 and pH 10, respectively.

5 The temperature of the environment in which measurements are made will influence the measurements to some extent. Furthermore, the sensor cannot be used above the temperatures at which the chemical or biological components used in the reaction space will be inactivated.

10 If the cofactor is oxygen, the detector is preferably electrochemical (claim 21), for instance the Clark-type oxygen microsensor, but other types such as optical detectors (claim 22) may also be applied. Fibre-optical oxygen microsensors are known from the literature.

15 The various diffusion permeable barriers delimiting the compartments of the micro-sensor have the function, among other things, to protect the materials in these spaces against desiccation and to prevent their dispersion. The barriers are preferably silica-based materials, which have proven to have a suitable permeability to especially gases. However, materials, which are permeable to diffusion of ions or polar compounds, can be used in combination with the use of micro-organisms capable of metabolising  
20 these ionic/polar compounds in the reaction space.

Measurements with the sensor can be performed in-situ and can be made within a response time of down to ½ minute. Thus the presence of for instance methane in for instance a fluid can be measured within a very short time and be measured continuously over a given period of time. The response time is mainly dependent on the dimensions of the sensor.  
25

Experiments have shown that the sensor can be minimised to such an extent that the sensitivity to stirring is below 2%. Thus the sensor according to the invention has no  
30 need for stirring. Furthermore, it is possible to produce a methane sensor with a signal, which is linear in the range of methane partial pressure from 0 to 1 atm. and with a sensitivity down to 0.001 atm. of methane.

The sensor according to the invention is primarily intended for the measurement of ethanol, methanol, ammonium and methane in microbial ecology, medicine, and in the control of industrial processes, including waste water treatment plants. Industries, producing measuring equipment, and industries, producing organic compounds in fermentors, are suited areas for the use of the sensor according to the invention. Furthermore, the sensor is well suited for use in bio-gas reactors and laboratories. It can be manufactured in glass using techniques for blowing and pulling glass described in the literature, using photolithographic processes, or using other suited processes, for instance those used in the fabrication of micro-mechanical components.

## CLAIMS

1. A microsensor for measuring the concentration of a primary substrate in an environment, such as a fluid, a gas or a matrix, which microsensor comprises a first casing (8) with an opening (9), which opening is in contact with a first barrier (10) and a reaction space (15) which borders on the first barrier (10), in which reaction space (15) a catalytic material is located, a material intended to catalyse a conversion of the primary substrate with the concomitant conversion of a secondary substrate, and which microsensor furthermore comprises a transducer (1) for the secondary substrate, which transducer (1) is located at a distance (A) from the first barrier, characterised in that the microsensor comprises a second casing (11), that the second casing (11) is supplied with an opening (12) in contact with a second diffusion permeable barrier (13), that the second barrier (13) is established at a distance from the first barrier (10) so that the reaction space (15) is formed in the first casing (8) between the first barrier (10) and the second barrier (13), and that the second casing (11) constitutes a source of the secondary substrate.
2. A microsensor according to claim 1, characterised in that a third casing extends around the first casing (7) and is provided with an opening, which abuts a third barrier arranged at a distance from the first barrier (9).
3. A microsensor according to claim 1 or 2, characterised in that the reaction space (10) contains an environment with chemical or biological components, that the second casing (5) contains a secondary substrate, and that the transducer (1) is intended for determining, by measuring the secondary substrate, the concentration of the primary substrate.
4. A microsensor according to claim 3, characterised in that the reaction space (10) contains an environment with methane oxidising bacteria, that the second casing (5) contains atmospheric air, and that the transducer (1) is intended for determining,

by measuring the concentration of oxygen in the distance (A) from the first barrier, the presence of methane in the medium.

5 5. A microsensor according to claim 3, characterised in that the reaction space (10) contains an environment with ammonia oxidising bacteria, that the second casing (5) contains atmospheric air, and that the transducer (1) is intended for determining, by measuring the concentration of oxygen in the distance (A) from the first barrier, the presence of ammonia in the medium.

10 6. A microsensor according to any one of the preceding claims, characterised in that the first barrier (9) and the second barrier (4), alternatively the first, the second and the third barrier, are made of silicone.

15 7. A microsensor according to any one of the preceding claims, characterised in that the first casing (7) and the second casing (5), alternatively the first, the second and the third casing, are made of glass.

20 8. A microsensor according to claim 2, characterised in that the third casing is provided with a so-called oxygen front stopper, and that the oxygen front stopper is chosen among electro-chemical front stoppers and bacteriological front stoppers.

25 9. A microsensor according to any one of the preceding claims, characterised in that the first casing is provided with a so-called oxygen back stopper, and that the oxygen back stopper is chosen among electro-chemical back stoppers and physical back stoppers.

30 10. The use of a microsensor according to any one of the preceding claims for measuring the presence of a primary substrate in an environment in the shape of a liquid, a matrix or a gas.

11. A microsensor for measuring the concentration of a substance in an environment such as a liquid, a gas or a matrix, which microsensor comprises:

- a reaction space containing biologically active or catalytic material for consuming or transforming the substance during concurrence consumption or concurrent transformation of a co-factor,
- a diffusion permeable outer barrier for delimitation of the reaction space, and
- 5 - a detector for the co-factor placed at a distance from the outer barrier;

characterised in that the reaction space is made in a diffusionally tight first casing (7) with an entrance opening (8), in which the outer barrier is placed, that the microsensor comprises a diffusion impermeable second casing (5), which abuts the reaction space, that the co-factor is present in a supply space in the second casing, that the second casing (5) has a connection opening (6) between the supply space and  
10 the reaction space, that the connection opening is arranged at a distance from the entrance opening, that a diffusion permeable middle barrier is placed in the connection opening, and that the detector is placed in the reaction space or in the middle barrier.

15 12. A microsensor according to claim 11, characterised in that the first casing is surrounded by a diffusion impermeable shielding casing with a shielding opening, in which a diffusion permeable shielding barrier is placed, and that in the shielding casing between the shielding barrier and the outer barrier a shielding space is made with shielding means to consume the co-factor without consuming the substance.

20

13. A microsensor according to claim 12, characterised in that the shielding means comprise a material comprising micro-organisms.

14. A microsensor according to claim 12, characterised in that the shielding  
25 means comprise an electrolyte, which is in connection with an electrode.

15. A microsensor according any one of the preceding claims, characterised in that in the first casing a deflection space is made for assimilation of the co-factor or possible products from the transformation of the substance with the co-factor, and that  
30 a deflection opening is present between the reaction space and the deflection space, and that the deflection opening is arranged at a distance from the entrance opening.

16. A microsensor according to claim 15, characterised in that a diffusion permeable deflection barrier is present in the deflection opening.
17. A microsensor according to claim 15 or 16, characterised in that deflection means are present in the deflection space for consuming the co-factor.
18. A microsensor according to claim 17, characterised in that the deflection means comprises an electrolyte, which is in connection with an electrode.
19. A microsensor according to one of claims 11-18, characterised in that the reaction space (10) contains methane oxidising bacteria, that the supply space contains atmospheric air, and that the detector (1) is designed to detect oxygen.
20. A microsensor according to one of claims 11-18, characterised in that the reaction space (10) contains ammonia oxidising bacteria, that the second casing (5) contains atmospheric air, and that the detector (1) is designed to detect oxygen.
21. A microsensor according to one of claims 11-20, characterised in that the detector is an electro-chemical detector.
22. A microsensor according to one of claims 11-20, characterised in that the detector is an optical detector.
23. A microsensor according to one of claims 11-22, characterised in that the barriers are made of a material based on silicone.
24. A microsensor according to one of claims 11-23, characterised in that the casings are made of glass.
25. A microsensor according to one of claims 11-22, characterised in that it is made by way of photolithography.

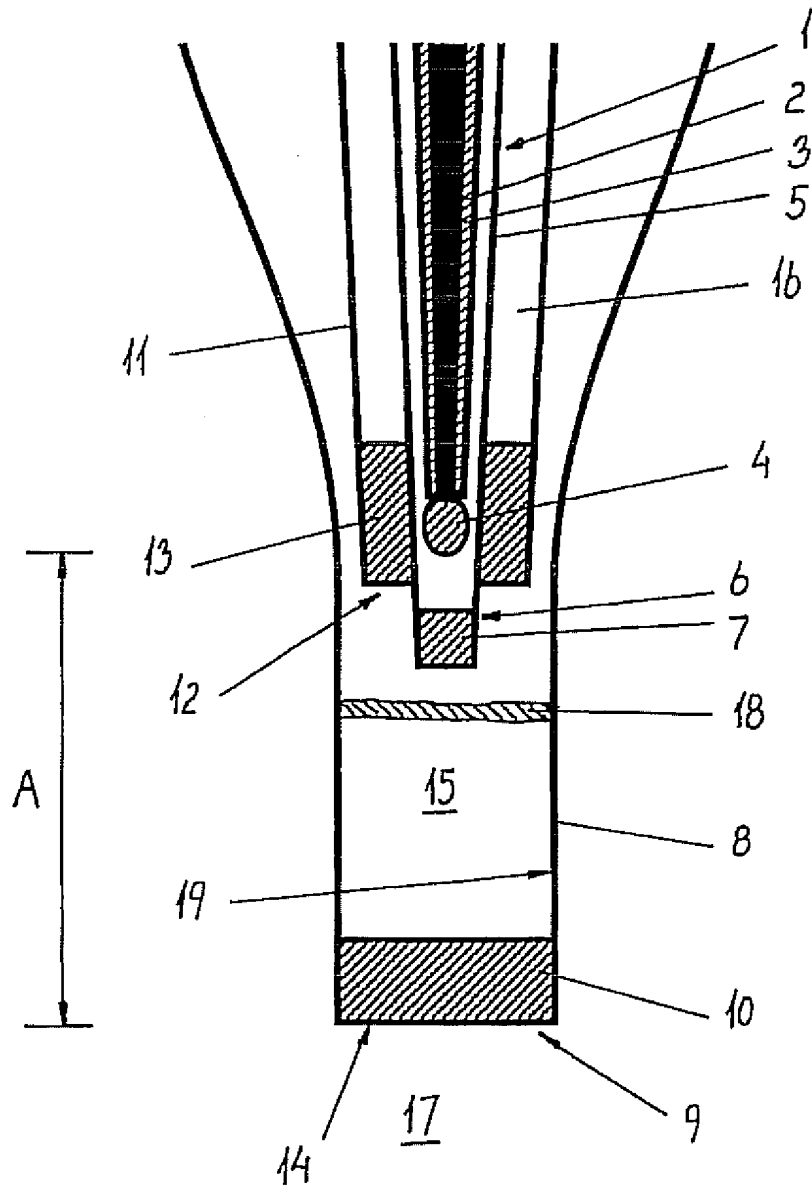


FIG. 1

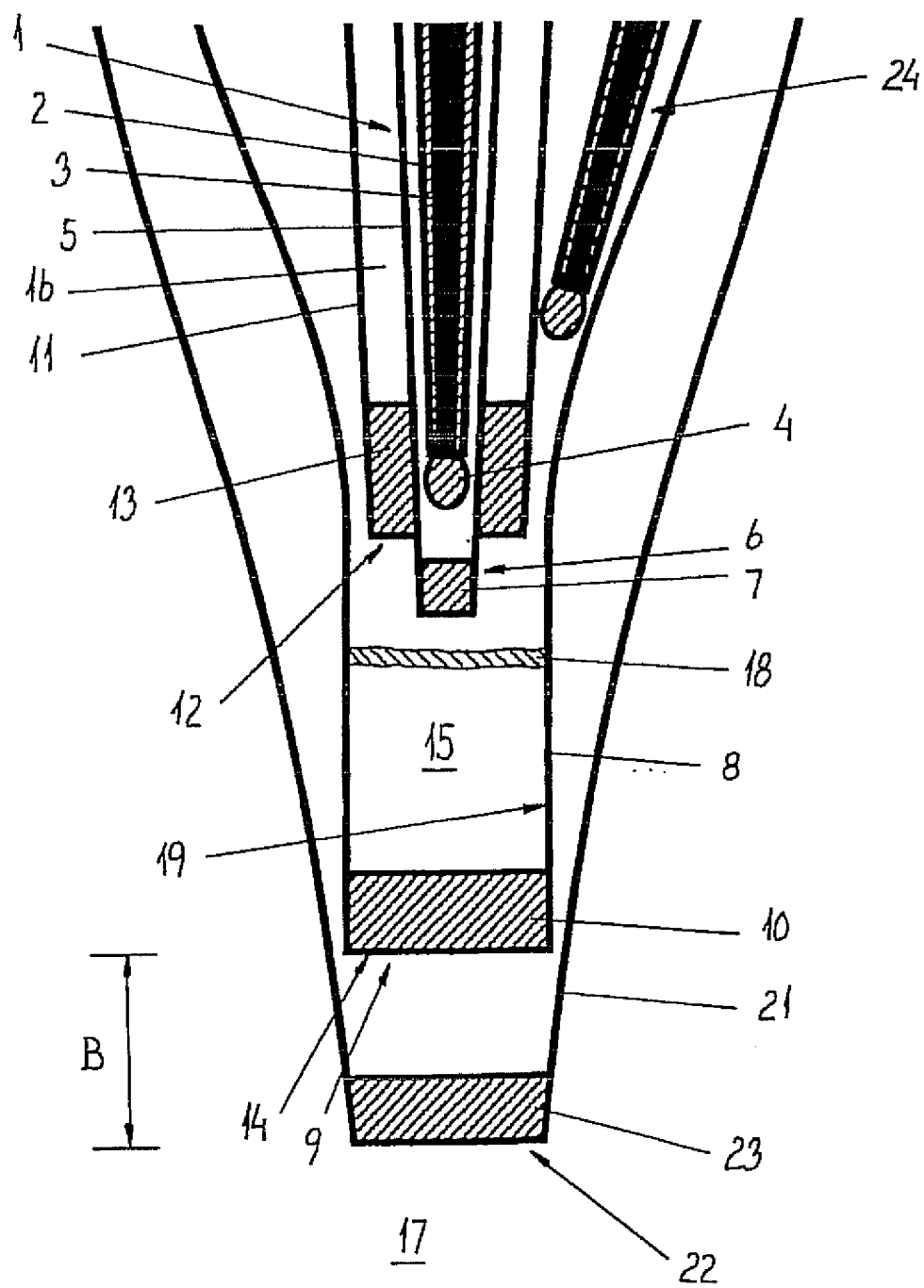
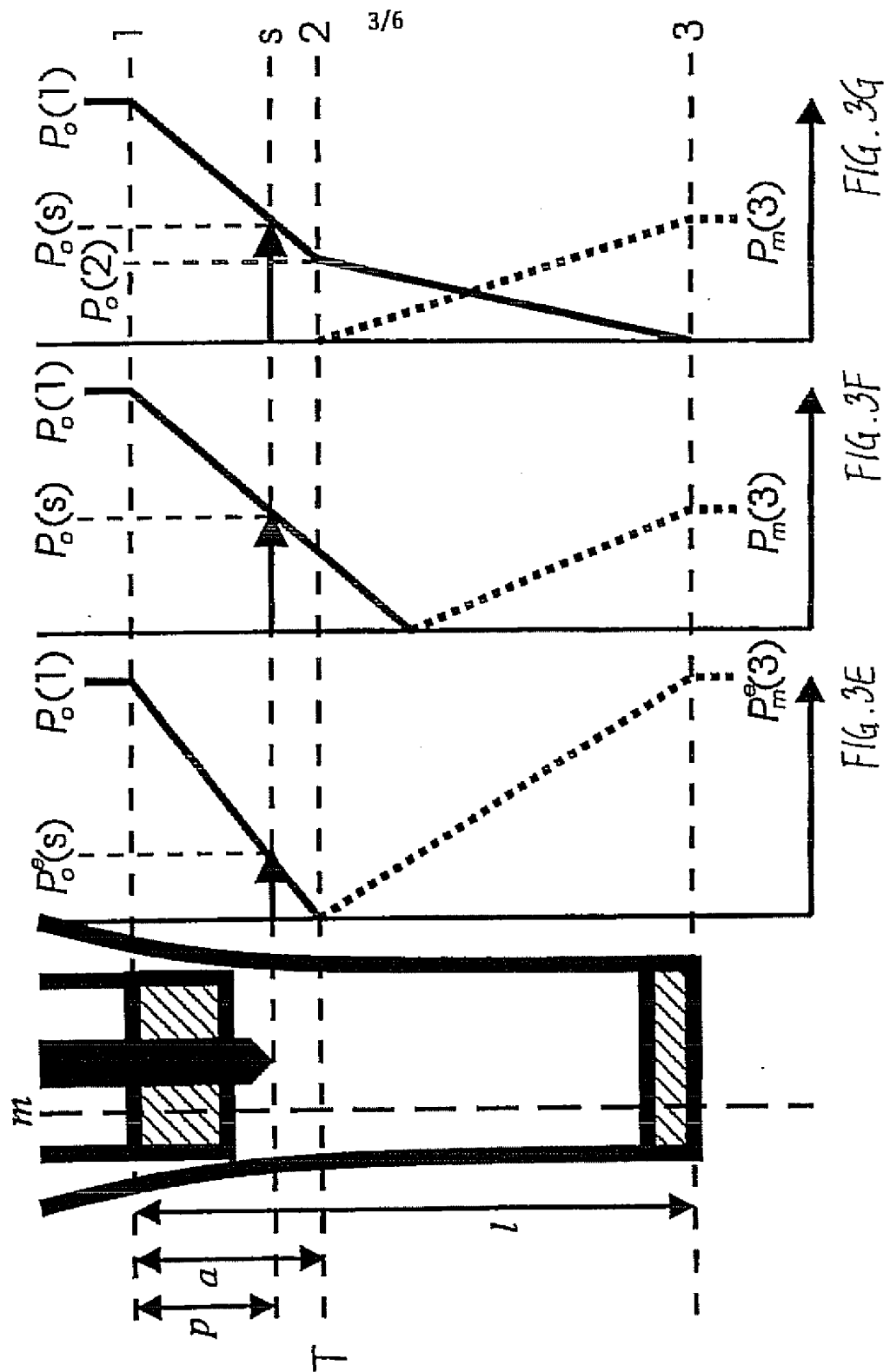
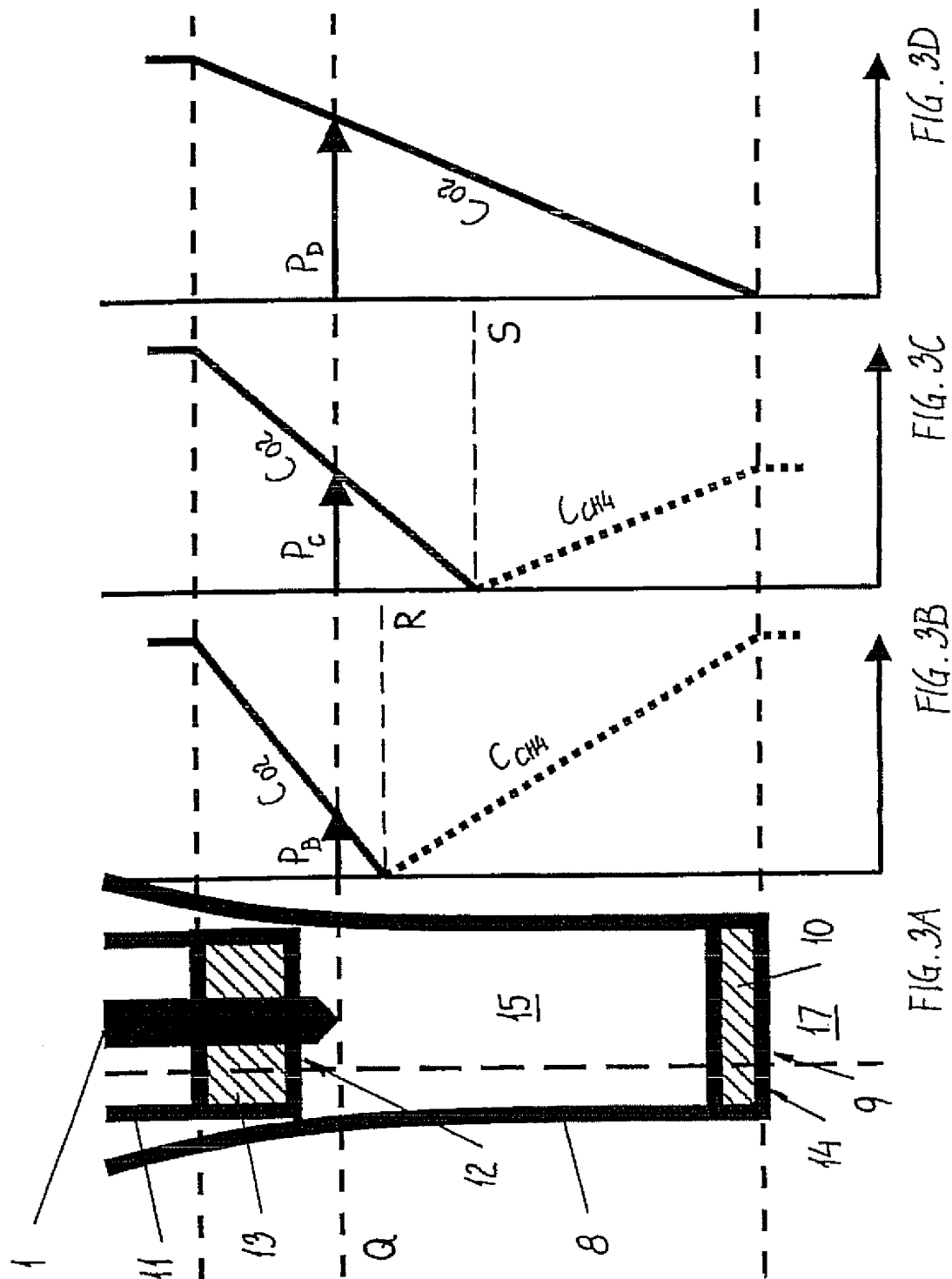


FIG. 2



4/6



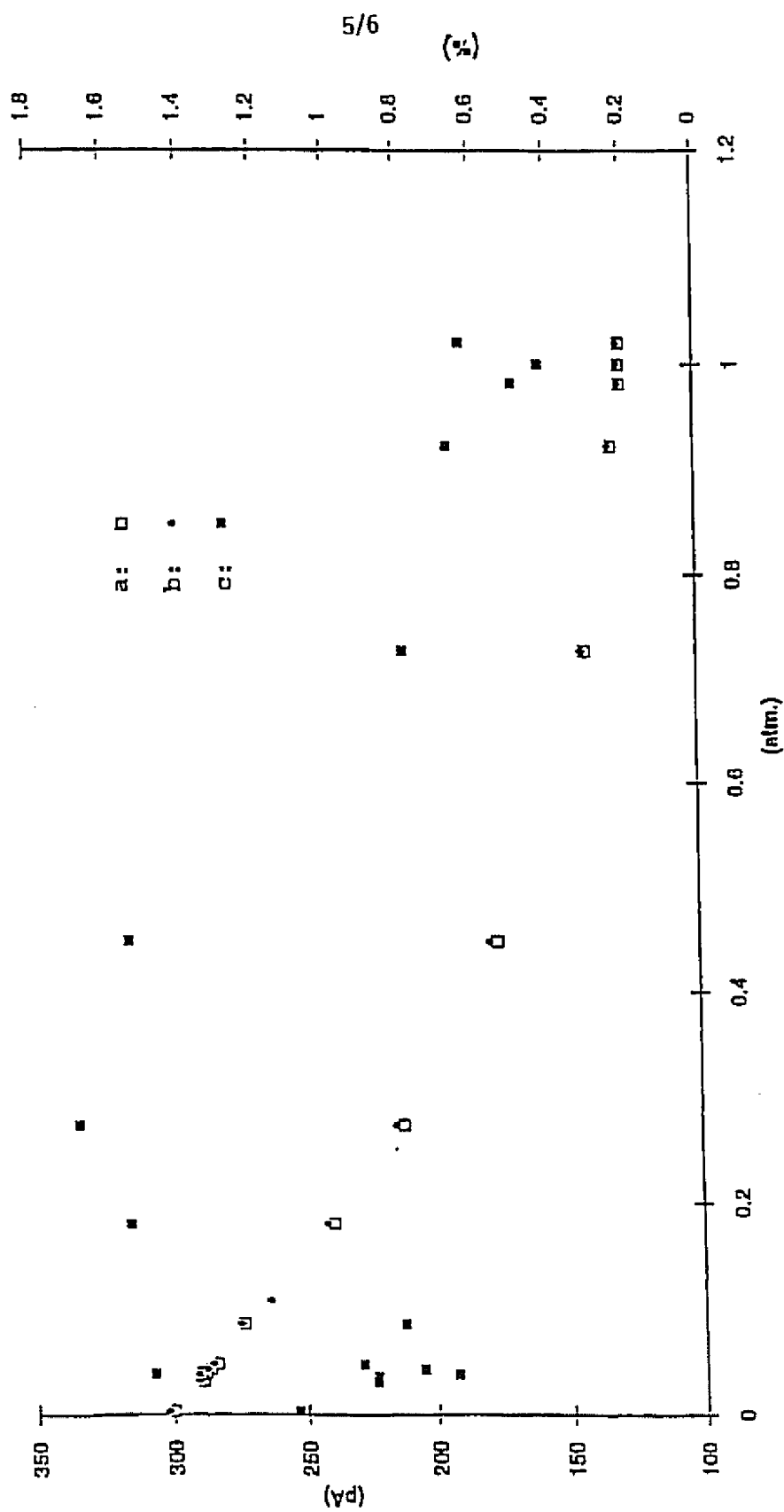


FIG. 4

6/6

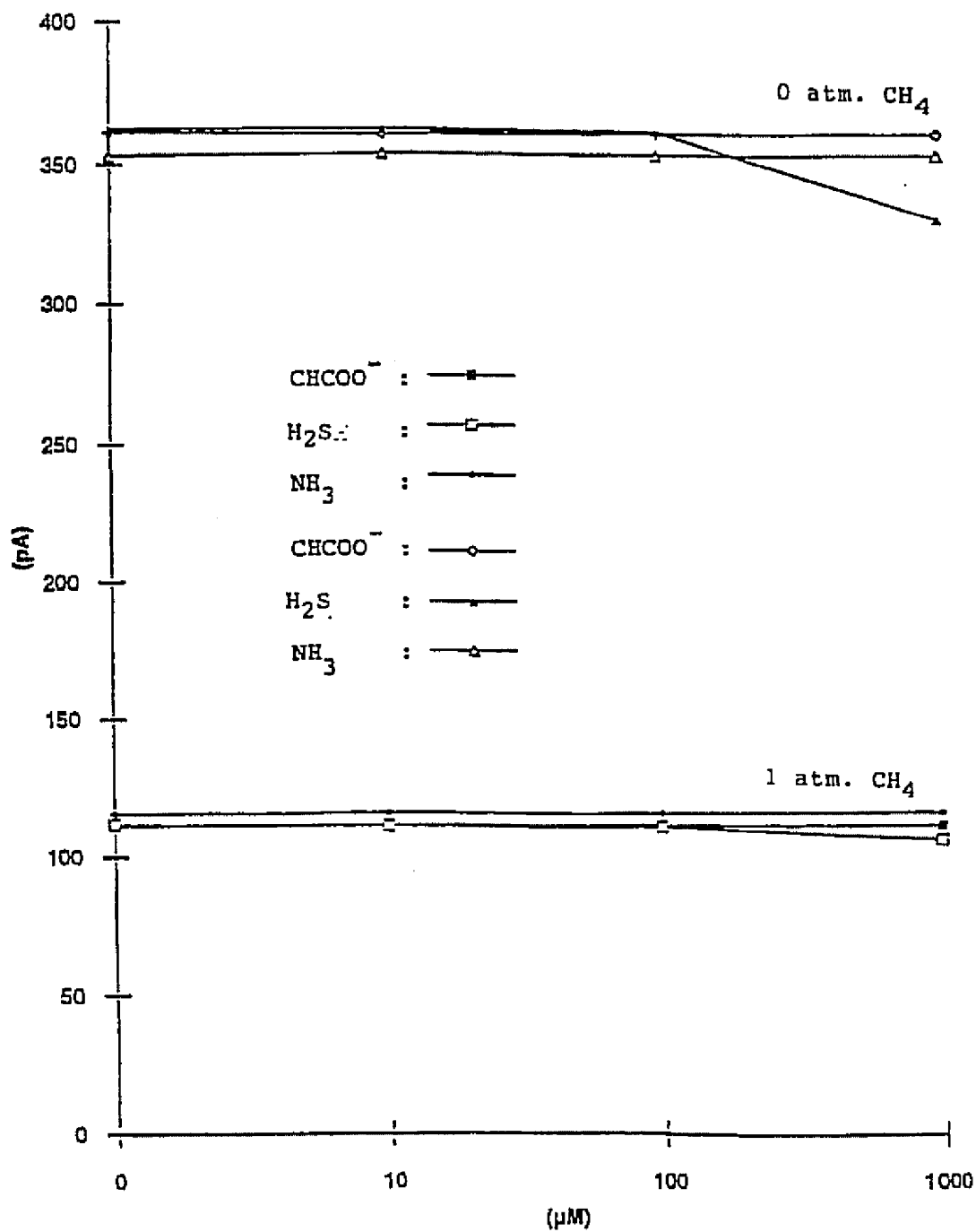


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 96/00488

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: G01N 27/30, G01N 27/403

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	US 5476001 A (GERHARD HOETZEL ET AL), 19 December 1995 (19.12.95), figures 1,2-3,5, claim 1, abstract --	1-25
A,P	FI 96140 B (VOIPIO, JUHA TUURI IMMANUEL), 31 January 1996 (31.01.96), figure 1, abstract --	1-25
A	US 3709812 A (L.W. NIEDRACH ET AL), 9 January 1973 (09.01.73), figure 1, abstract --	1-25
A	US 3957613 A (ROBERT A. MACUR), 18 May 1976 (18.05.76), figure 1, abstract --	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 March 1997

13 -03- 1997

Name and mailing address of the ISA/  
Swedish Patent Office  
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM  
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Tommy Vikholm  
Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 96/00488

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3900382 A (JOHN F. BROWN, JR.), 19 August 1975 (19.08.75), figure 1, abstract  -----	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

03/02/97

International application No.  
PCT/DK 96/00488

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 5476001	19/12/95	DE-A- 4243734	30/06/94
		EP-A- 0627078	07/12/94
		JP-T- 7504040	27/04/95
		WO-A- 9415206	07/07/94
		DE-A- 4311849	20/10/94
		DE-U- 9301164	25/03/93
		FR-A,B- 2700813	29/07/94
		IT-V- MI940028	18/01/94
FI-B- 96140	31/01/96	FI-A- 931986	04/11/94
US-A- 3709812	09/01/73	DE-A- 2151783	20/04/72
		FR-A- 2110024	26/05/72
		NL-A- 7114319	18/04/72
US-A- 3957613	18/05/76	BE-A- 835102	16/02/76
		DE-A- 2548405	13/05/76
		FR-A- 2289908	28/05/76
		GB-A- 1528183	11/10/78
		JP-A- 51068294	12/06/76
		SE-A- 7512240	03/05/76
US-A- 3900382	19/08/75	DE-A- 2548406	06/05/76
		FR-A,B- 2289909	28/05/76
		GB-A- 1517950	19/07/78
		JP-A- 51068293	12/06/76